

Informe final ID2017_69

Edición Génica Mediante el Sistema CRISPR-Cas



Ester Gangoso Rodríguez Scottish Center for Regenerative Medicine Edinburgh University, Scotland, U.K. Unidad de Investigación Consolidada 013 USAL	María Sacristán Martín Centro de investigación del Cáncer Dpto. de Microbiología y Genética USAL	Fernando Leal Sánchez Instituto de Biología Funcional y Genómica Dpto. de Microbiología y Genética USAL
--	--	---

Resumen

El sistema CRISPR-Cas nos ha proporcionado una oportunidad excepcional para desarrollar una enseñanza más aplicada y actual en Microbiología y Biología molecular y además mentalizar a los estudiantes de cómo la ciencia, llamada básica, es indispensable para desarrollar posteriormente una ciencia aplicada.

Hemos completado el plan de trabajo en todos sus puntos. Para ello se diseñó un recurso en **Studium (ID2017_69)** que se puso a disposición de los estudiantes (como actividad de Seminarios evaluable) en la asignatura Diversidad Microbiana del tercer curso del Grado en Biología. Un total de 185 matriculados, distribuidos en dos grupos de Teoría y cuatro de Seminarios. La participación ha sido masiva y entusiasta y creemos haber alcanzado todos los objetivos propuestos.

En este proyecto hemos llevado a cabo una primera aproximación más teórica y virtual al sistema que, dado que consideramos ha dado los resultados esperados, podría dar paso a un segundo proyecto más práctico. Según las propias opiniones de los estudiantes, utilizando el recurso han adquirido unas bases teóricas sólidas sobre el sistema CRISPR-Cas que les han capacitado para utilizar de manera fluida las herramientas proporcionadas para el diseño e interpretación de los experimentos. Se consideran asimismo capacitados para profundizar en el autoaprendizaje y la formación continua en esta tecnología.

Cumplimiento del Plan de Trabajo Propuesto

1 y 2) La primera fase se desarrolló fundamentalmente durante el primer cuatrimestre del curso 2017-18, antes del comienzo de la asignatura Diversidad Microbiana. Se recopiló, analizó y estudió toda la bibliografía pertinente y se elaboraron los tutoriales, descritos mas adelante, que más tarde servirían de guía en la realización de actividades. Se creó una Unidad de Equipo en **Google Drive** para que los tres integrantes del proyecto pudieran subir, compartir y editar los materiales que se iban creando. Todos estos materiales, más los vídeos y textos introductorios correspondientes se incorporaron al curso de [Studium ID2017_69 Edición Génica mediante el sistema CRISPR-Cas](#) cuya estructura se resume a continuación. Los tutoriales se incluyen al final del informe a modo de apéndices.

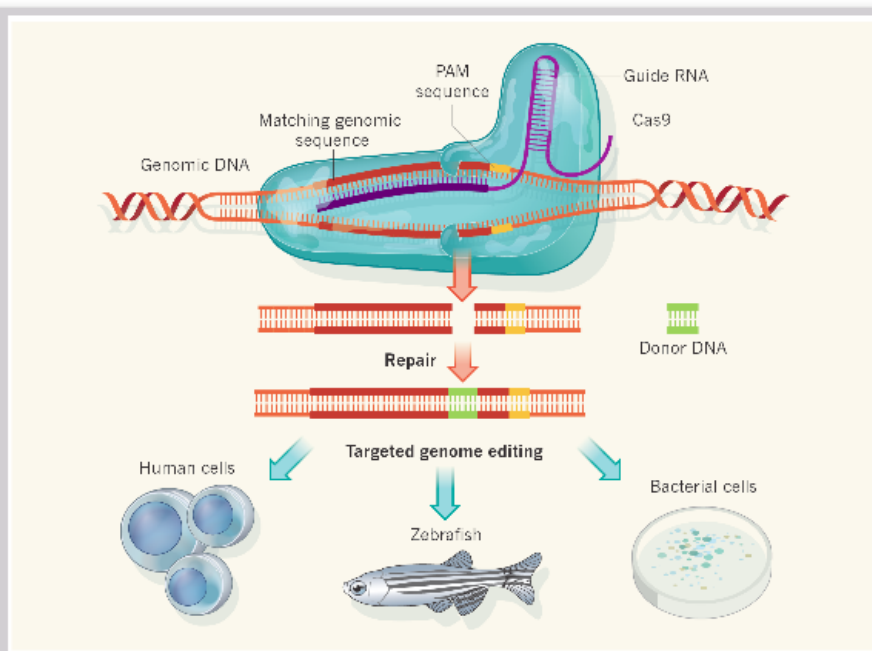
1.- Objetivos del Recurso ID2017_69

Editar

Edición Génica Mediante el Sistema CRISPR-Cas

Ester Gangoso (1), María Sacristan (2,4) y Fernando Leal (3,4)

(1) Scottish Center for Regenerative Medicine. Edinburgh University. Edinburgh. UK (2) Centro de Investigación del Cancer. CSIC/USAL. Salamanca. Spain (3) Instituto de Biología Funcional y Genómica. CSIC/USAL (4) Dpto Microbiología y Genética. USAL Salamanca. Spain





Cualquier persona, con un mínimo interés en los adelantos biomédicos, seguro que ha escuchado o leído noticias sobre la herramienta de edición génica más potente desarrollada recientemente y denominada de forma abreviada CRISPR-Cas. Esta tecnología ha captado la atención de los medios de comunicación, del público en general, de los políticos y por supuesto de los estudiantes de cualquier campo relacionado con la Biología. Estamos asistiendo al nacimiento de diversas aplicaciones basadas en CRISPR para modificar y estudiar los genomas de cualquier organismo sea cual sea el dominio del árbol de la vida al que pertenezca.

Esperamos que utilizando este recurso los estudiantes adquieran unas bases teóricas sólidas sobre el sistema CRISPR-Cas que les permitan utilizar de manera fluida los recursos proporcionados para el diseño e interpretación de los experimentos. Para lograrlo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- 1) Facilitar a los estudiantes la comprensión de las bases teóricas de los experimentos de edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas
- 2) Recopilar y poner a su disposición los recursos on-line necesarios para el diseño e interpretación de dichos experimentos
- 3) Facilitar el uso de estos recursos mediante la elaboración de tutorial ejemplo
- 4) Proporcionar los enlaces a la literatura más reciente en el tema para permitir la adquisición independiente de una formación más avanzada y un autoaprendizaje continuado.



+ 2.- ¿Qué es CRISPR-Cas y como se usa para editar genomas?

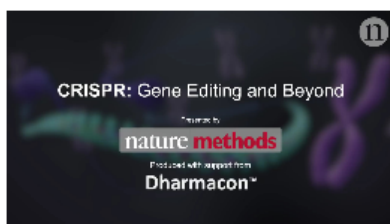
Editar


- +  ¿Que es CRISPR-Cas y como se usa para editar genomas?  10.1MB documento PDF Uploaded 16/03/2018 09:58 Editar

- +  MIT Video: CRISPR-Cas fundamento y posibilidades (Click aqui)  Editar



- +  NATURE Video: CRISPR-Cas fundamento y posibilidades (Click aqui)  Editar




 Agregar una actividad o recurso

+ 2.1.- Videos Simposio Fundación Ramón Areces CRISPR y Enfermedades raras (Febrero 2018)

Editar

- +  Videos Simposio Areces CRISPR y Enfermedades raras  Editar

Aqui podeis encontrar los videos correspondientes a las intervenciones de los ponentes en este interesante Simposio que abrió Francisco JM Mojica

 Agregar una actividad o recurso


+ 3.- ¿Cómo localizar la secuencia del gen que queremos modificar?


Editar

Para modificar cualquier gen, lo primero que debemos hacer es recopilar toda la información necesaria sobre él:

- ¿En qué cromosoma se localiza?
- ¿Cual es su estructura, sus variantes?
- ¿Cómo, cuándo, cuánto y dónde se expresa?
- Y, por supuesto, ¿cuál es su secuencia?
- Si queremos interferir su función, debemos saber cual es el dominio responsable de ella, para alterarlo de forma específica.

Para ello existen diferentes recurso en la WEB y uno de ellos, como ejemplo, puede utilizarse siguiendo el tutorial que se presenta.

- +  Tutorial para localizar la secuencia de un gen determinado  Editar

 Agregar una actividad o recurso

✚ 4.- ¿Cómo diseñar las guías que nos servirán para editar el gen? 🍷

Editar

Existen multitud de aplicaciones WEB de Universidades, Centros de Investigación o Empresas que permiten encontrar la secuencia más adecuada que deben presentar las sgRNAs para editar el gen de interés de la forma más efectiva y específica. Se recopilan a continuación una serie de ellas, especificando sus ventajas. Para comprender mejor su funcionamiento, se incluye también al final un sencillo tutorial sobre el uso de una de ellas (**CHOP CHOP**).

Software disponible para el diseño de sgRNA

(Cesar, S. A., V. Rajan, S. V. Prykhodj, J. N. Berman and S. Ignacimuthu (2016). "Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9." *Biophysica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863(9): 2333-2344)

Name of the tool	Web Address	Main additional features
sgRNA Designer	http://www.broadinstitute.org/mai/public/analysis-tools/sgna-design	Efficacy prediction
CRISPRscan	http://www.crisprscan.org/	Efficacy prediction, Off-target prediction
SSC	http://cistrome.org/SSC/	Efficacy prediction
sgRNA Scorer	https://crispr.med.harvard.edu/	Efficacy prediction
WU-CRISPR	http://crispr.wustl.edu/	Efficacy prediction, Off-target prediction
E-CRISP	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/	Design for multiple purposes
CRISPR Design	http://crispr.mit.edu/	Off-target prediction
Cas9 Design	http://www.biooools.com/nd.jsp?id=37	SNP matching to target sites
ZiFiT Targeter	http://zifit.partners.org/ZiFiT/	Flexible target definition
CRISPR-P	http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR	Focus on plant species and off-target prediction
CRISPRdirect	http://crispr.dbcls.jp/	Off-target predictions
CHOPCHOP (Tutorial tras la tabla)	https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/	Off-target prediction, PCR assay design

CCTop	http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/	Off-target prediction, flexible target site definition
Cas9 Online Designer	http://cas9.wicp.net/	Off-target prediction
sgRNAcas9	http://www.biooools.com/col.jsp?id=103	Off-target prediction, local installation
CRISPRseek	http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.html	R/Bioconductor tool, off-target prediction, allele-specific sgRNA design
CRISPR MultiTargeter	http://www.multicrispr.net/	sgRNA design for common and unique sgRNA sites in transcript isoforms and duplicated genes, flexible target definition
CRISPR-ERA	http://crispr-era.stanford.edu/	Multiple purposes: knock-out, knock-in, CRISPRi and gene activation
Cas-OFFinder	http://www.rgenome.net/cas-offinder/	Off-target prediction
GT-Scan	https://gt-scan.csiro.au/	Off-target prediction
CasOT	http://casot.cbi.pku.edu.cn/	Off-target prediction, local installation



Tutorial sobre el uso de CHOP CHOP para diseño de sgRNAs 🍷 documento PDF

Editar

➕ Agregar una actividad o recurso


✚ 5.- Y ahora que he diseñado mis guías... ¿Cómo edito el gen que quiero? ✎

Editar

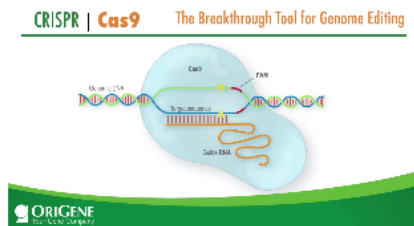
En los dos vídeos siguientes podeis comprobar de forma sencilla como se lleva a cabo la edición génica en las células que nos interesen. Pueden ser líneas celulares establecidas o bien células que se extraen de un enfermo (por ejemplo células sanguíneas) y una vez editadas podrían teóricamente reintroducirse de nuevo en el paciente para corregir un defecto genético concreto.


Los dos vídeos pueden visionarse de forma independiente, pero es aconsejable hacerlo en orden para una mejor comprensión.

Ademas de OriGene, existen diferentes casas comerciales que ofrecen todo lo necesario para desarrollar nuestro experimento. Además, los diferentes plásmidos, guías, oligos, etc.. pueden diseñarse y construirse en el propio laboratorio, introduciendo todas las modificaciones que se consideren adecuadas para un óptimo rendimiento del sistema.

✚  OriGene Video: Aprendizaje rápido de experimentos con CRISPR-Cas (Click aquí) ✎

Editar



✚  OriGene Video: Protocolo Experimental detallado de CRISPR-Cas (Click aquí) ✎


Editar



✚ Agregar una actividad o recurso

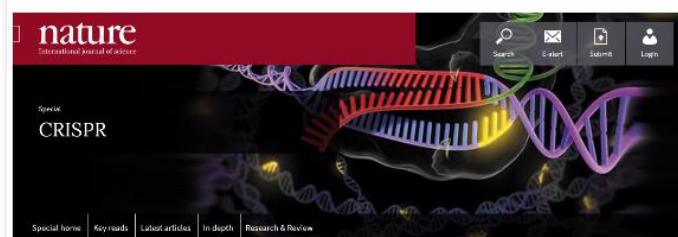
✚ 6.- Referencias Bibliográficas Seleccionadas ✎

Editar

✚  NATURE Special CRISPR ✎

Editar

Investigadores de todo el mundo están adoptando rápidamente la tecnología CRISPR-Cas9 para manipular los genomas de humanos, virus, bacterias, animales y plantas. Nature recopila las investigaciones, noticias y opiniones de los expertos para mantenernos al día de los avances más recientes



✚  Referencias Seleccionadas CRISPR ✎

Editar 

✚ Agregar una actividad o recurso

3) Antes de dar acceso al **primer tutorial** en Studium, (Marzo) se abrió un cuestionario para evaluar los conocimientos previos sobre el tema de los estudiantes. Se les insistió en no buscar información para contestarlo. El contenido del cuestionario se muestra a continuación, aunque los resultados se incluirán más adelante en una comparativa con los obtenidos tras completar el curso.

4 Recursos 102617_08 - CUESTIONARIO INICIAL: ¿Qué sabes del sistema CRISPR... - > Vista previa

Comenzado el jueves, 5 de julio de 2018, 13:51

Estado Finalizado

Finalizado en jueves, 5 de julio de 2018, 13:54

Tiempo empleado 3 minutos 10 segundos

Calificación 0 de un máximo de 10 (0%)

Pregunta 1
Sin contestar
Puntaje como 1

CRISPR es un acrónimo que describe:

Seleccione una:

- a. Na/Nc
- b. Secuencias agrupadas cortas que forman palíndromos regulares sin espaciadores
- c. Fenómenos de crispación en los genomas
- d. Agrupaciones de palíndromos regulares con espaciadores cortos
- e. Agrupaciones de secuencias palindrómicas cortas espaciadas regularmente
- f. Secuencias palindrómicas cortas espaciadas sin agrupar

Respuesta incorrecta.

Pregunta 2
Sin contestar
Puntaje como 1

La denominación Cas se refiere a:

Seleccione una:

- a. Una proteína humana con actividad endonucleásica
- b. Una proteína bacteriana con actividad endonucleásica
- c. Una enzima de restricción humana
- d. Una enzima de restricción bacteriana
- e. Na/Nc
- f. Una exonuclease bacteriana

Respuesta incorrecta.

Pregunta 3
Sin contestar
Puntaje como 1

La edición génica CRISPR-Cas se puede utilizar en:

Seleccione una:

- a. Na/Nc
- b. Todos los eucariotas
- c. Humanos
- d. Todos los Organismos y Microorganismos conocidos
- e. Todos los procariontes
- f. Bacterias y Hongos

Respuesta incorrecta.

Pregunta 4
Sin contestar
Puntaje como 1

¿Cuáles crees que sean posibles aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas?

Seleccione una:

- a. El marcaje de proteínas con sondas fluorescentes o de otro tipo
- b. Curación de algunos tipos de cáncer
- c. Reparación de enfermedades genéticas (raras, metabólicas)
- d. Todas las propuestas
- e. Na/Nc
- f. La activación o represión de rutas metabólicas

Respuesta incorrecta.

Pregunta 5
Sin contestar
Puntaje como 1

¿Cuál es la secuencia de bases que forma una secuencia PAM y es reconocida por Cas?

Seleccione una:

- a. Na/Nc
- b. 5'-NCC
- c. 5'-GGN
- d. 5'-NGG
- e. 5'-CCN
- f. 5'-GNG

Respuesta incorrecta.

Pregunta 6
Sin contestar
Puntaje como 1

El sistema CRISPR evolucionó originalmente para:

Seleccione una:

- a. Na/Nc
- b. Proteger a los humanos frente a cualquier ADN exógeno
- c. Immunizar a bacterias frente a las infecciones por bacteriófagos y frente a cualquier ADN endógeno
- d. Immunizar a bacterias frente a las infecciones por bacteriófagos
- e. Proteger a las bacterias frente a ADN plasmídico exógeno
- f. Immunizar a humanos frente a las infecciones por virus

Respuesta incorrecta.

Pregunta 7
Sin contestar
Puntaje como 1

En la tecnología de edición génica mediante CRISPR-Cas, ¿a qué nos referimos al hablar de "off targets"?

Seleccione una:

- a. Unión y corte realizado por Cas en lugares no deseados del ARN mensajero
- b. Na/Nc
- c. A la inactivación de un CRISPR
- d. Unión y corte realizado por Cas en un CRISPR genómico
- e. Unión y corte realizado por Cas en lugares no deseados del ADN genómico
- f. A la inactivación de la proteína Cas

Respuesta incorrecta.

Pregunta 8
Sin contestar
Puntaje como 1

¿Cuál de las siguientes variantes de Cas no existe en realidad?

Seleccione una:

- a. Cpf1
- b. Na/Nc
- c. Cas9 Caspasa
- d. HFCas9
- e. Cas9
- f. Cas9 Nickasa

Respuesta incorrecta.

Pregunta 9
Sin contestar
Puntaje como 1

Las mejores sgRNAs son las que tienen...

Seleccione una:

- a. Na/Nc
- b. Mayor eficiencia y mayor número de off targets
- c. Mayor eficiencia y menor número de off targets
- d. Menor eficiencia y mayor número de off targets
- e. Menor eficiencia y menor número de off targets
- f. Simplemente mayor eficiencia

Respuesta incorrecta.

Pregunta 10
Sin contestar
Puntaje como 1

¿Cuál de los siguientes recursos WEB NO sirve para diseñar sgRNAs?

Seleccione una:

- a. CCTop
- b. sgRNA Scorer
- c. IteNc
- d. CHOPCHOP
- e. Snap Guide
- f. CRISPR Design

Respuesta incorrecta.

4) Tras cerrar el cuestionario inicial se impartieron cuatro seminarios introductorios presenciales (uno a cada grupo de 45 alumnos) se hizo visible el recurso en Studium y se publicitó entre los estudiantes para su acceso y consulta entre Marzo y Junio. Los profesores estimularon constantemente a la participación a través del Foro correspondiente, respondiendo allí mismo o por correo electrónico a las dudas o consultas que iban surgiendo.

5) Se modificó el cuestionario inicial descrito en el punto 3 (incluyendo apartados más complejos) para evaluar la eficacia del aprendizaje de los estudiantes. Puede consultarse el **Cuestionario Final** en el apartado de apéndices.

¿Qué has aprendido del sistema CRISPR-Cas?

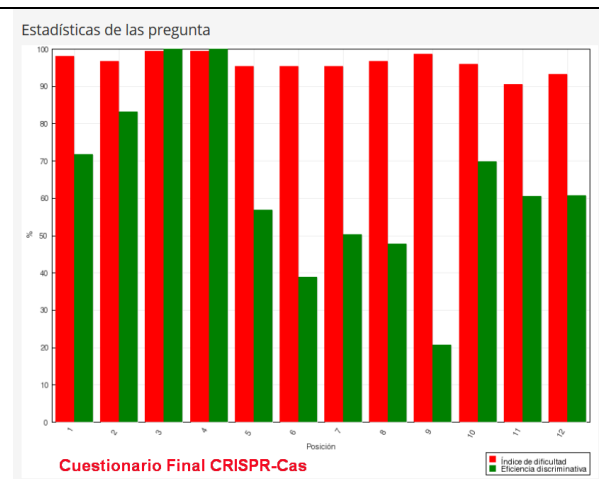
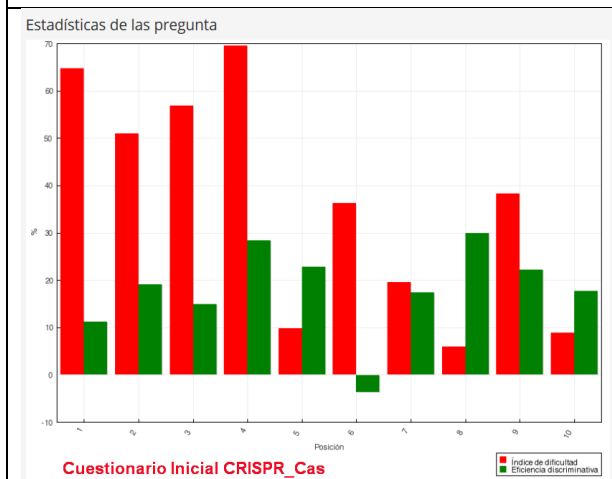
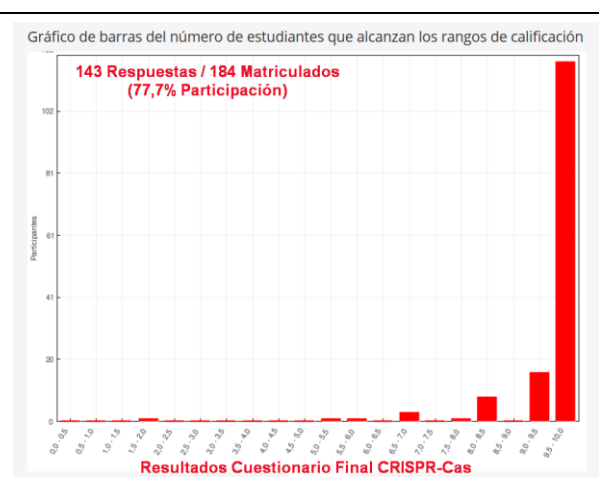
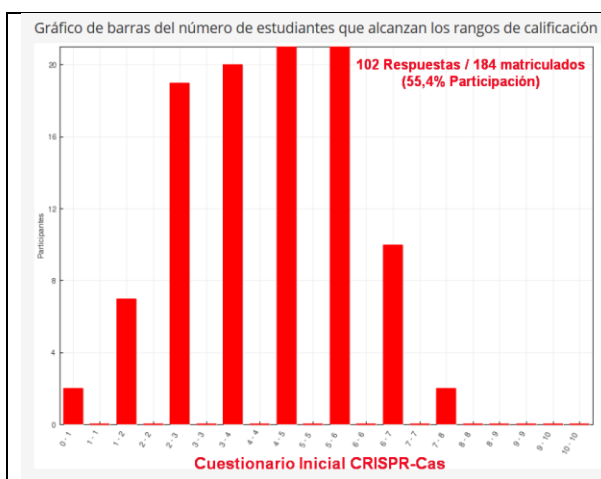
Para evaluar los conocimientos que habéis adquirido después de las sesiones de Seminarios y la utilización del recurso de Edición Génica (CRISPR-Cas) de Studium, os rogamos que intentéis responder el cuestionario que se plantea. Toda la información necesaria se os ha proporcionado ya o está en el recurso. Además se os da retroalimentación sobre dónde encontrarla.

Para estimular vuestra participación, el cuestionario estará abierto hasta el 14 de JUNIO. Podéis realizar todos los intentos que hagan falta, sin penalización alguna, para obtener la máxima calificación, que será la que se aplique a la actividad de Seminario A06 de la asignatura de Diversidad Microbiana.

Debéis seleccionar únicamente una respuesta, la que consideréis más adecuada

Muchas gracias por vuestra colaboración

Los resultados obtenidos fueron muy estimulantes, tanto por el aumento de participación observado (55 a 77% de los alumnos matriculados), como por el grado de consecución de objetivos, puesto de manifiesto por la espectacular mejora constatada (Mediana de calificación alrededor de 5/10 en el inicial frente a 9,5/10 en el final). Se analizan a continuación en cuatro gráficos comparativos.



6) Una vez finalizados los exámenes y entregadas las calificaciones, se elaboró y aplicó una encuesta configurable de Studium para recoger las opiniones de los alumnos y utilizarla en la mejora del recurso.

Encuesta Valoración Recurso ID2017_69

Con el fin de ayudarnos a mejorarlo en posteriores versiones, te rogamos que selecciones las respuestas que creas mas adecuadas para valorar los diferentes aspectos del Recurso de Edición Génica mediante CRISPR

1 *

Valore el interés del Recurso

- ☐ 1 - Carente de interés
- ☐ 2 - Trivial
- ☐ 3 - Entretenido sin más
- ☐ 4 - Interesante
- ☐ 5 - Muy Interesante

2 *

Valore la dificultad que ha encontrado para completar el recurso

- ☐ 1 - Imposible de seguir
- ☐ 2 - Muy difícil de seguir
- ☐ 3 - Difícil de seguir
- ☐ 4 - Fácil de seguir
- ☐ 5 - Muy fácil de seguir

3 *

Valore la temporalización del recurso en el contexto de la asignatura Diversidad Microbiana

- ☐ 1 - Se propone excesivamente pronto
- ☐ 2 - Se propone pronto
- ☐ 3 - Se propone tarde
- ☐ 4 - Se propone excesivamente tarde
- ☐ 5 - Se propone en el momento justo

4 *

Valore, en su experiencia personal, la carga de trabajo para el alumno

- ☐ 1 - Es excesiva, imposible de asumir
- ☐ 2 - Es muy alta, difícil de asumir
- ☐ 3 - Es alta pero asumible
- ☐ 4 - Se asume fácilmente
- ☐ 5 - Es baja, se asume sin esfuerzo

5 *

Valore si la información se presenta organizada adecuadamente. Si quiere matizar algo hágalo en el apartado de Sugerencias.

- ☐ 1 - La organización de los módulos es pésima
- ☐ 2 - La organización de los módulos no es la adecuada
- ☐ 3 - Da igual el orden en que se presenta la información
- ☐ 4 - La organización de los módulos es buena pero cambiaría algo
- ☐ 5 - La organización de los módulos es perfecta

6 *

Marque todos los recursos que haya consultado. Posteriormente se le preguntará sobre su utilidad.

- ☐ 1 - Cuestionario Inicial
- ☐ 2 - Cuestionario Final
- ☐ 3 - PDF ¿Qué es CRISPR-Cas y como se usa...?
- ☐ 4 - Videos Introductorios MIT ó Nature
- ☐ 5 - Videos Simposio Fundación Ramón Areces
- ☐ 6 - Tutorial ¿Cómo localizar la secuencia del gen...?
- ☐ 7 - Tutorial ¿Como diseñar las guías...?
- ☐ 8 - Videos OriGene protocolo experimental de CRISPR-Cas

7 *

Marque todos los recursos que haya encontrado útiles

- ☐ 1 - Cuestionario Inicial
- ☐ 2 - Cuestionario Final
- ☐ 3 - PDF ¿Qué es CRISPR-Cas y como se usa...?
- ☐ 4 - Videos Introductorios MIT ó Nature
- ☐ 5 - Videos Simposio Fundación Ramón Areces
- ☐ 6 - Tutorial ¿Cómo localizar la secuencia del gen...?
- ☐ 7 - Tutorial ¿Como diseñar las guías...?
- ☐ 8 - Videos OriGene protocolo experimental de CRISPR-Cas

8 *

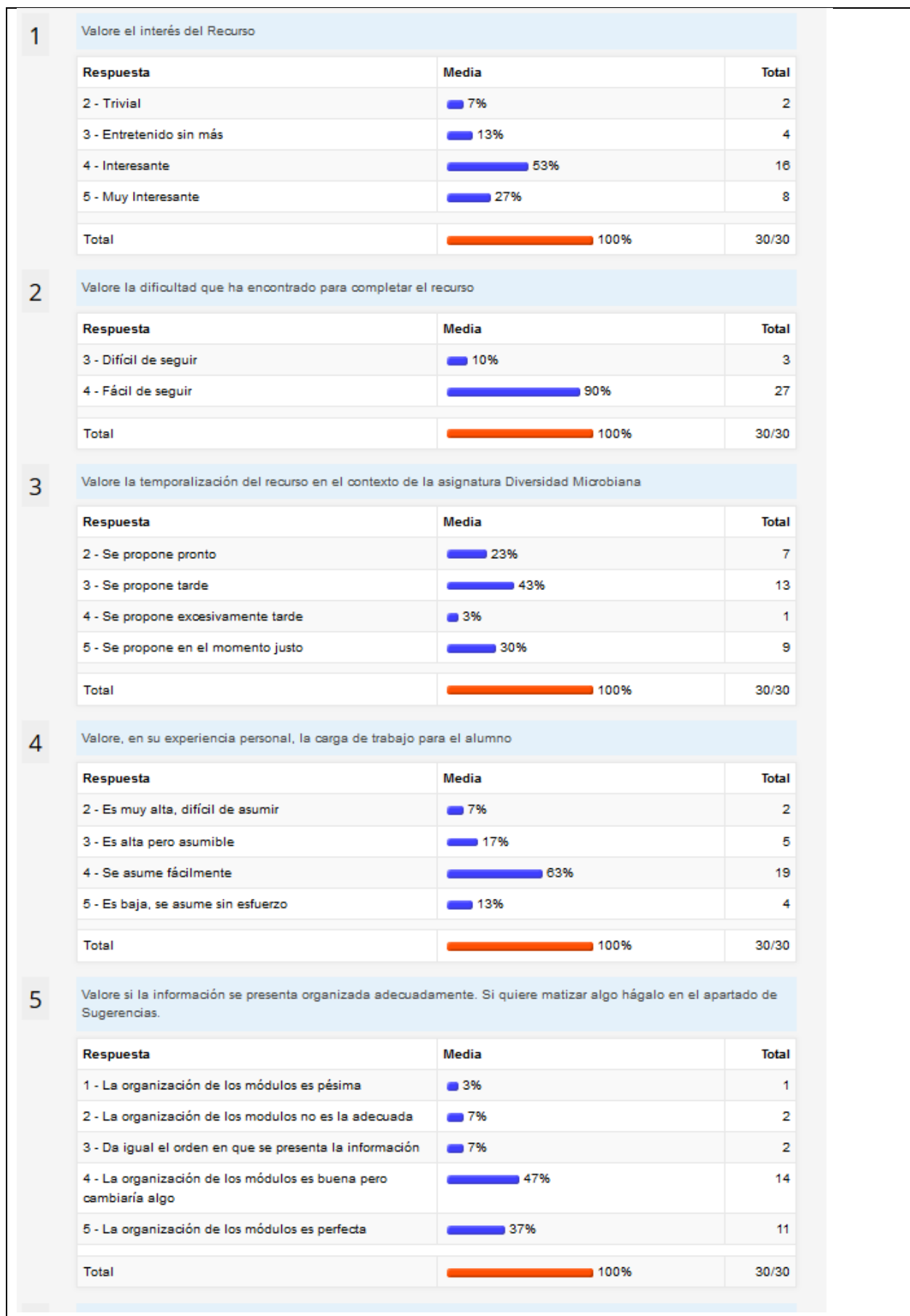
Valore el cumplimiento de objetivos del Recurso seleccionando todas aquellas casillas que crea pertinente. Si desea matizar algo hágalo en el apartado de Sugerencias

- ☐ 1 - Se facilita a los estudiantes la comprensión de las bases teóricas de los experimentos de edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas
- ☐ 2 - Se recopila y pone a disposición de los estudiantes los recursos on-line necesarios para el diseño e interpretación de dichos experimentos
- ☐ 3 - Se facilita el uso de estos recursos mediante la elaboración de tutoriales ejemplo
- ☐ 4 - Se proporcionan los enlaces a la literatura más reciente en el tema para permitir la adquisición independiente de una formación más avanzada y un autoaprendizaje continuado

9 *

Sugerencias para la mejora del Recurso

Los resultados de la encuesta se muestran y analizan a continuación. Las preguntas 1 a 4 evalúan el planteamiento temporal del curso y su dificultad para los estudiantes.



6

Marque todos los recursos que haya consultado. Posteriormente se le preguntará sobre su utilidad.

Respuesta	Media	%	Total
1 - Cuestionario Inicial	18%	80,0	24
2 - Cuestionario Final	21%	93,3	28
3 - PDF ¿Qué es CRISPR-Cas y como se usa...?	20%	90,0	27
4 - Videos Introductorios MIT ó Nature	8%	36,7	11
5 - Videos Simposio Fundación Ramón Areces	5%	20,0	6
6 - Tutorial ¿Cómo localizar la secuencia del gen...?	11%	50,0	15
7 - Tutorial ¿Como diseñar las guías...?	8%	36,7	11
8 - Videos OriGene protocolo experimental de CRISPR-Cas	8%	36,7	11
Total	100%		133/30

7

Marque todos los recursos que haya encontrado útiles

Respuesta	Media	%	Total
1 - Cuestionario Inicial	13%	46,7	14
2 - Cuestionario Final	23%	83,3	25
3 - PDF ¿Qué es CRISPR-Cas y como se usa...?	24%	90,0	27
4 - Videos Introductorios MIT ó Nature	6%	23,3	7
5 - Videos Simposio Fundación Ramón Areces	4%	13,3	4
6 - Tutorial ¿Cómo localizar la secuencia del gen...?	11%	40,0	12
7 - Tutorial ¿Como diseñar las guías...?	12%	43,3	13
8 - Videos OriGene protocolo experimental de CRISPR-Cas	8%	30,0	9
Total	100%		111/30

8

Valore el cumplimiento de objetivos del Recurso seleccionando todas aquellas casillas que crea pertinente. Si desea matizar algo hágalo en el apartado de Sugerencias

Respuesta	Media	%	Total
1 - Se facilita a los estudiantes la comprensión de las bases teóricas de los experimentos de edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas	29%	86,7	26
2 - Se recopila y pone a disposición de los estudiantes los recursos on-line necesarios para el diseño e interpretación de dichos experimentos	28%	83,3	25
3 - Se facilita el uso de estos recursos mediante la elaboración de tutoriales ejemplo	20%	60,0	18
4 - Se proporcionan los enlaces a la literatura más reciente en el tema para permitir la adquisición independiente de una formación más avanzada y un autoaprendizaje continuado	22%	66,7	20
Total	100%		89/30

9

Sugerencias para la mejora del Recurso

Conclusiones:

Aunque únicamente 30 estudiantes respondieron a la encuesta final (de un total de 185 matriculados) se pueden extraer algunas conclusiones de sus respuestas y sugerencias. Más del 80% de los estudiantes que utilizaron el curso lo encuentran **interesante, fácil de seguir** y, aunque reconocen que les lleva trabajo, creen que es **asumible** (Preg. 1, 2 y 4). Un 46% creen que se **debiera comenzar antes** la actividad para disponer de más tiempo (Preg. 3).

El 84% opinan que el contenido del curso está **bien organizado** (Preg. 5), un 37% estima que **se podrían hacer cambios** aunque no sugieren cuales. Los estudiantes dicen **utilizar todos los recursos**, aunque no todos en la misma medida ni con la misma utilidad. (Preg. 6 y 7) Los más consultados y útiles son los cuestionarios, en especial el final y el Tutorial general introductorio que complementa el seminario teórico. Hay una correlación positiva entre el uso de un recurso y su consideración como útil (93,3 y 90% frente a 83,3 y 90% para los dos recursos citados). Por el contrario, no se observa una correlación clara entre la utilidad de los Tutoriales para avanzar en el recurso y su utilización efectiva (Preg. 8).

Más de un 80% considera que se han alcanzado los objetivos 1 y 2 y más del 60% los 3 y 4.

Finalmente, en el apartado de sugerencias, destaca la petición de **empezar antes** la actividad y reforzarla con al menos **otro seminario presencial**. También se deduce que habría que incrementar el número o mejorar la calidad de los tutoriales. Asimismo es de destacar la **retroalimentación positiva a los Profesores**, agradeciéndoles la iniciativa y el esfuerzo empleado en la elaboración y seguimiento del recurso.

APÉNDICES

- 1.- Tutorial PDF: ¿Qué es CRISPR-Cas y como se usa para editar genomas?
- 2.- Tutorial PDF: Cómo Localizar la secuencia de un gen determinado.
- 3.- Tutorial PDF: Uso de la WEB *CHOP-CHOP* para el diseño de sgRNAs
- 4.- PDF: Cuestionario Final

***El sistema CRISPR/Cas:
Sistema Inmunológico de Bacterias y Arqueas
y sus Aplicaciones***

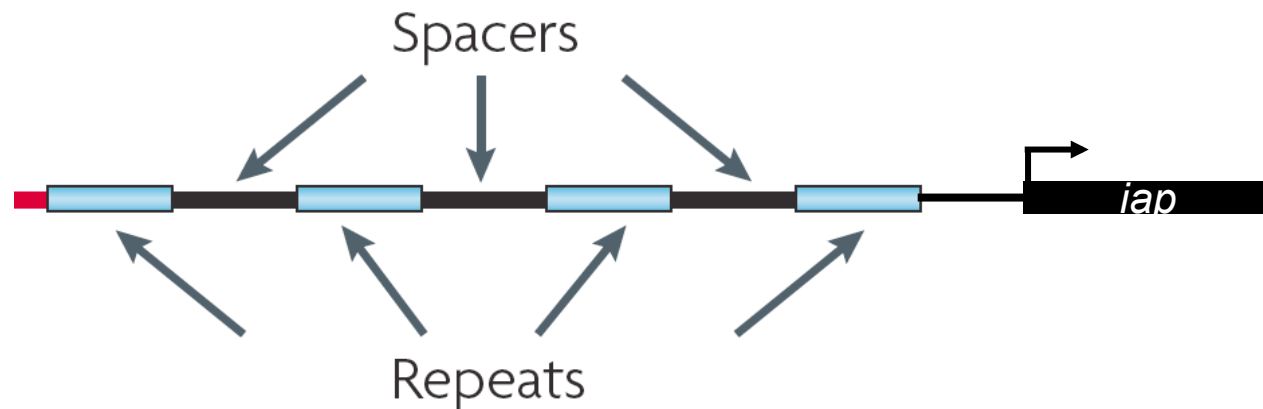
Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product

YOSHIZUMI ISHINO, HIDEO SHINAGAWA, KOZO MAKINO, MITSUKO AMEMURA, AND ATSUO NAKATA*

Department of Experimental Chemotherapy, The Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Received 1 May 1987/Accepted 22 August 1987

1. De forma casual, en las proximidades del gen “*iap*” se identifica un **fragmento de DNA “inusual”** consistente en repeticiones palindrómica cortas, flanqueadas por fragmentos únicos de DNA, “**espaciadores**”, de significado desconocido.



Investigadores Españoles identifican secuencias CRISPR

molecular
microbiology

[Explore this journal >](#)

Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst*I sites

F. J. M. Mojica, G. Juez, F. Rodríguez-Valera [✉](#)

First published: August 1993 [Full publication history](#)

DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x [View/save citation](#)



[View issue TOC](#)
Volume 9, Issue 3
August 1993
Pages 613-621



Francisco J. Martínez Mojica
Universidad de Alicante

molecular
microbiology

[Explore this journal >](#)

Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the *Archaea Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning

F.J.M. Mojica, C. Ferrer, G. Juez, F. Rodríguez-Valera [✉](#)

First published: July 1995 [Full publication history](#)

DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x [View/save citation](#)



[View issue TOC](#)
Volume 17, Issue 1
July 1995
Pages 85-93

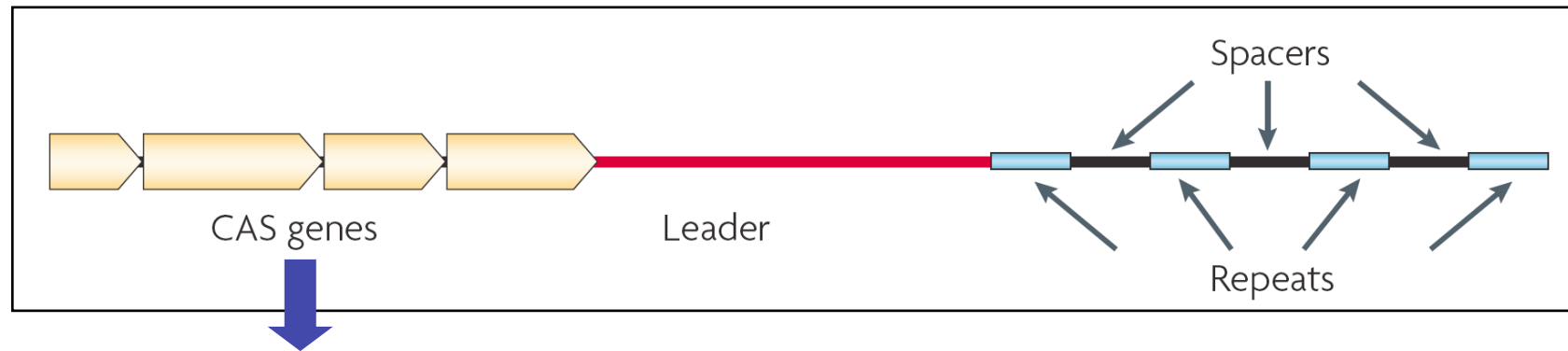
2. Identificación del mismo tipo de “fragmentos de DNA” en muchas otras Bacterias y Arqueas



Locus CRISPR

(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

3. Identificación de **genes CAS** (CRISPR-associated genes) adyacentes a dicho locus
(Jansen et al., 2002 Mol Microbiol 43:1565-75)



Enzimas Endonucleasas

*4. Las secuencias de los espaciadores en el locus CRISPR son secuencias similares a **FAGOS** o **PLÁSMIDOS***

*5. Se sugiere que CRISPR puede **mediar INMUNIDAD** frente a la infección con agentes extra cromosomales*

Referencias:

- Bolotin et al. (2005) *Microbiology* **151**:2551-2561
- Pourcel et al. (2005) *Microbiology* **151**:653-663
- Mojica et al. (2005) *Journal Mol. Evol.* **60**:174-182

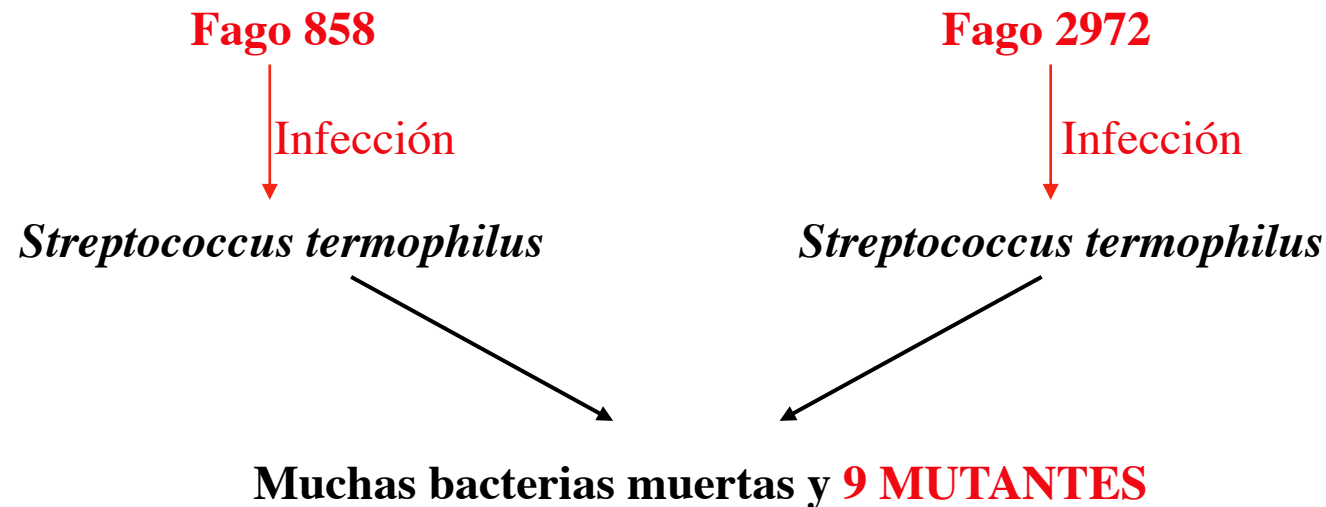
6. Se confirma que tras la infección con fagos, las bacterias adquieren secuencias derivadas del fago (nuevos espaciadores) y ello les confiere “inmunidad” frente a una nueva infección por el fago

CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes

Rodolphe Barrangou,¹ Christophe Fremaux,² Hélène Deveau,³ Melissa Richards,¹ Patrick Boyaval,² Sylvain Moineau,³ Dennis A. Romero,¹ Philippe Horvath^{2*}

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are a distinctive feature of the genomes of most Bacteria and Archaea and are thought to be involved in resistance to bacteriophages. We found that, after viral challenge, bacteria integrated new spacers derived from phage genomic sequences. Removal or addition of particular spacers modified the phage-resistance phenotype of the cell. Thus, CRISPR, together with associated *cas* genes, provided resistance against phages, and resistance specificity is determined by spacer-phage sequence similarity.

23 MARCH 2007 VOL 315 SCIENCE www.sciencemag.org



6. Se confirma que tras la infección con fagos, las bacterias adquieren secuencias derivadas del fago (nuevos espaciadores) y ello les confiere “inmunidad” frente a una nueva infección por el fago

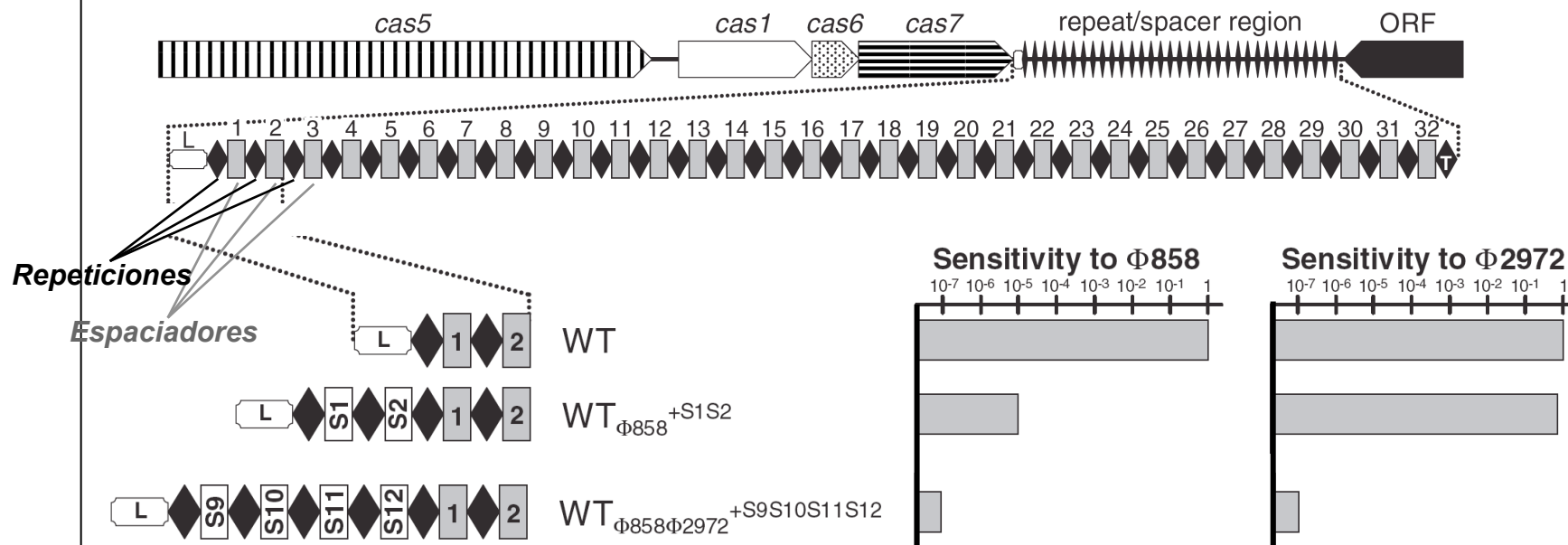
CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes

Rodolphe Barrangou,¹ Christophe Fremaux,² Hélène Deveau,³ Melissa Richards,¹ Patrick Boyaval,² Sylvain Moineau,³ Dennis A. Romero,¹ Philippe Horvath^{2*}

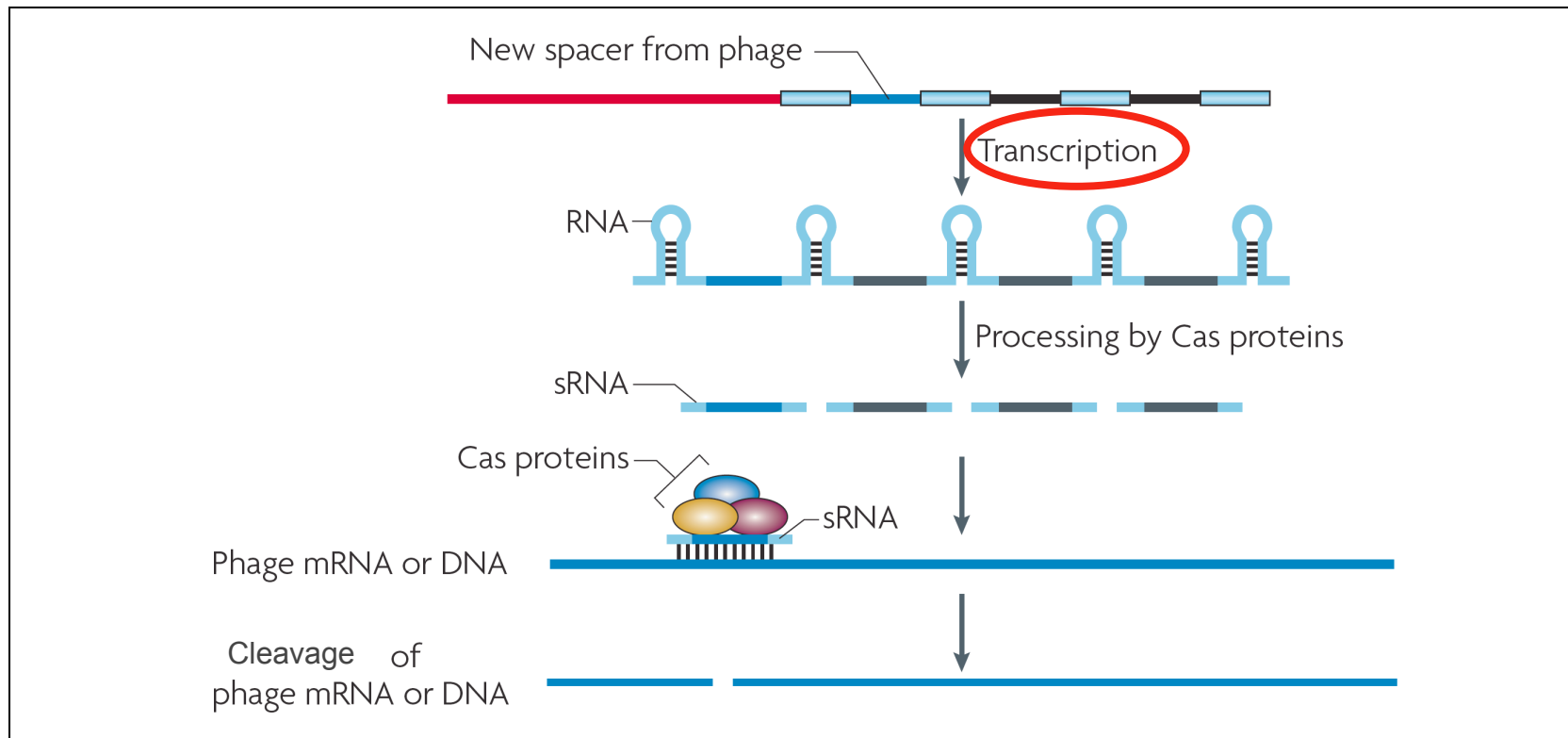
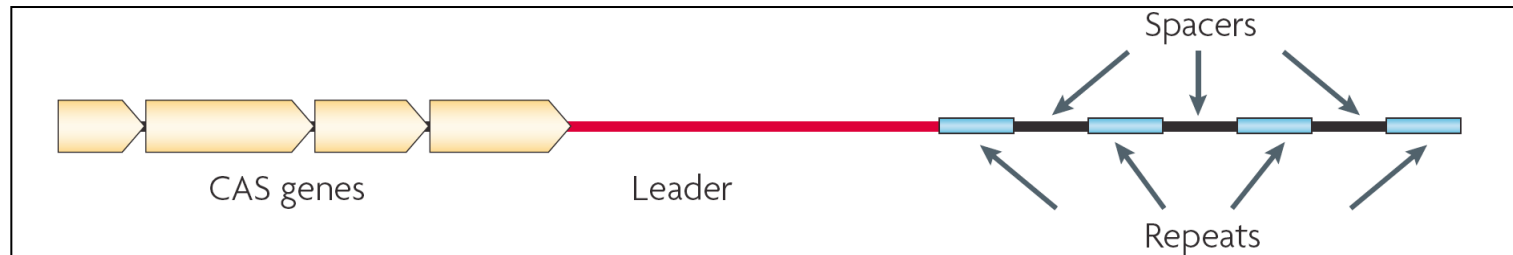
Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are a distinctive feature of the genomes of most Bacteria and Archaea and are thought to be involved in resistance to bacteriophages. We found that, after viral challenge, bacteria integrated new spacers derived from phage genomic sequences. Removal or addition of particular spacers modified the phage-resistance phenotype of the cell. Thus, CRISPR, together with associated *cas* genes, provided resistance against phages, and resistance specificity is determined by spacer-phage sequence similarity.

23 MARCH 2007 VOL 315 SCIENCE www.sciencemag.org

Streptococcus thermophilus

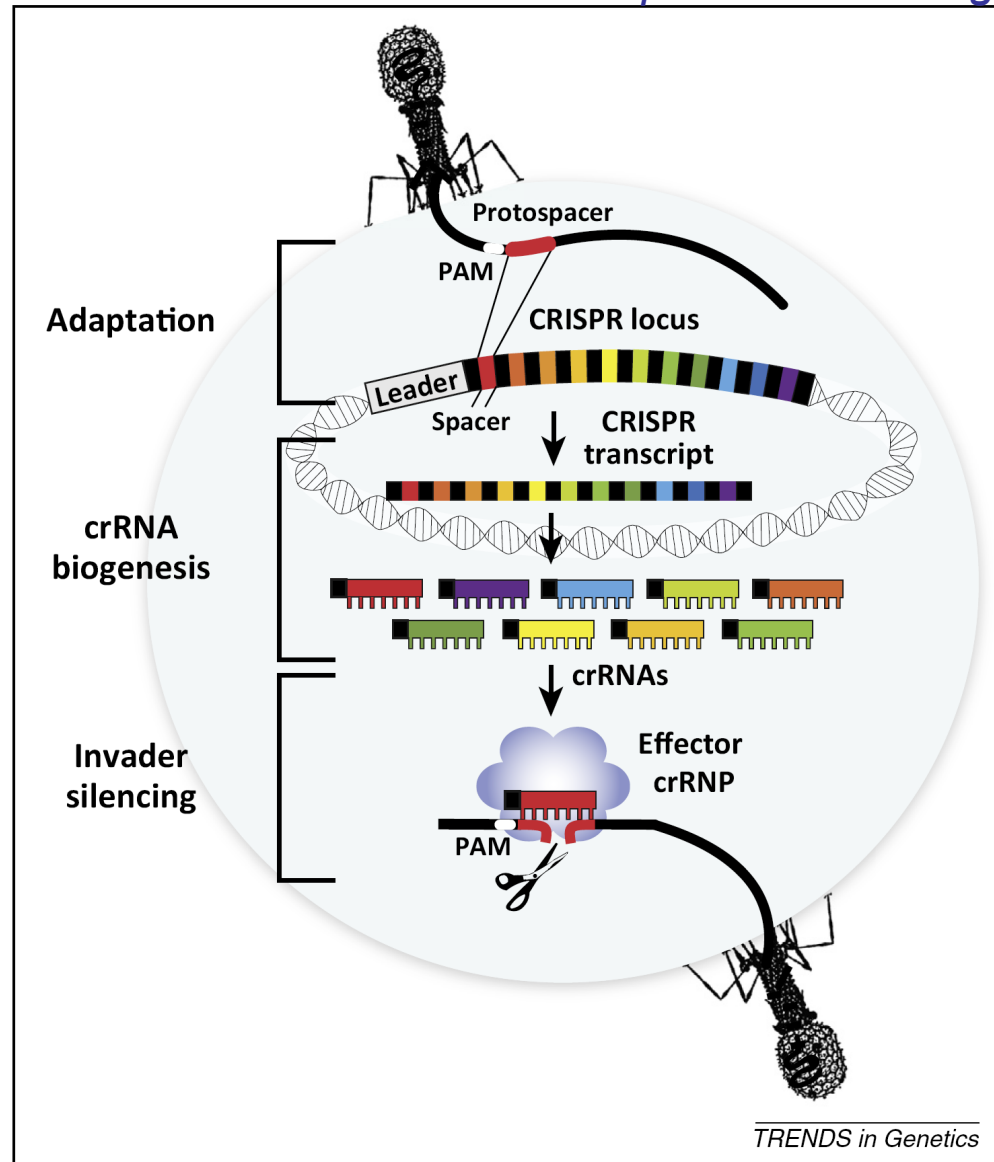


Estructura y Función del Sistema CRISPR-Cas



(Adaptado de Sorek et al., Nat Rev. Microbiology 2008)

Tras la infección por un fago, algunas bacterias adquieren secuencias derivadas del fago (espaciadores) y ello les **confiere “inmunidad/protección”** frente a nuevas infecciones por el mismo fago



PAM: protospacer adjacent motif

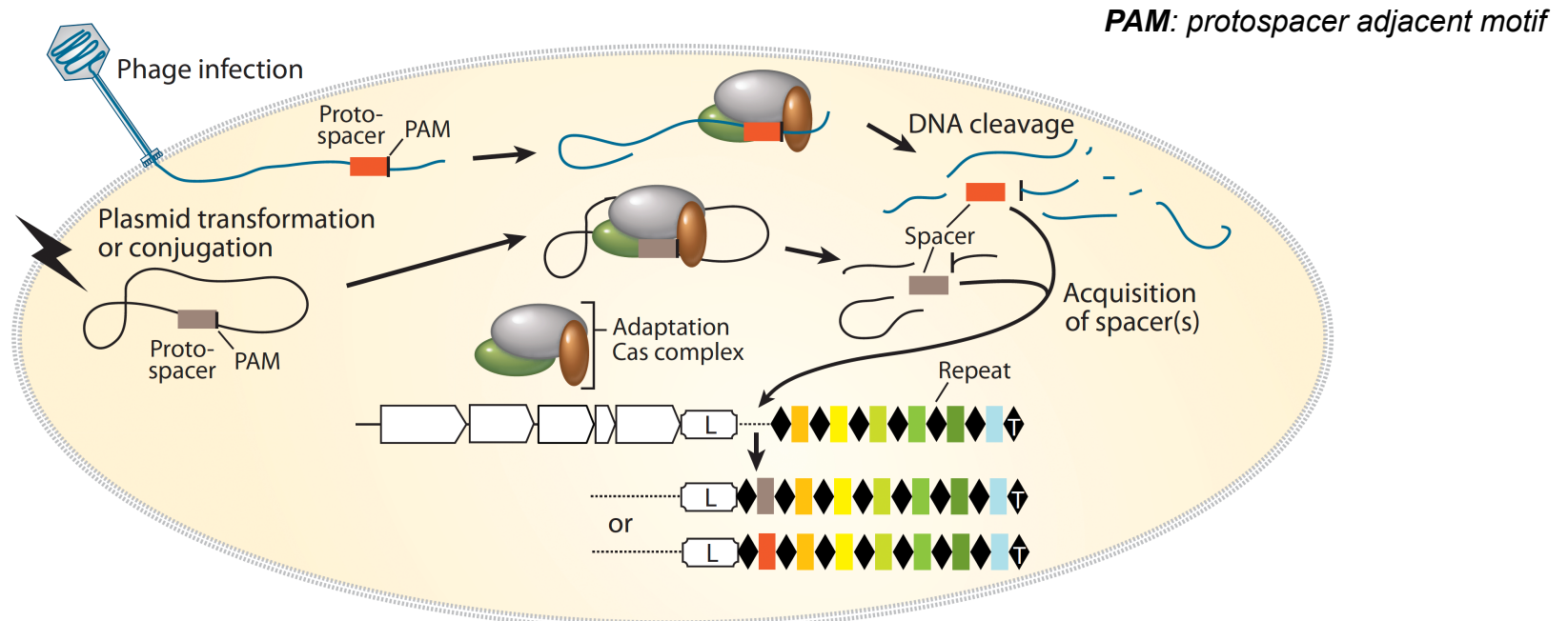
crRNA: CRISPR RNA

crRNP: crRNA + Cas

(Terns and terns 2014)

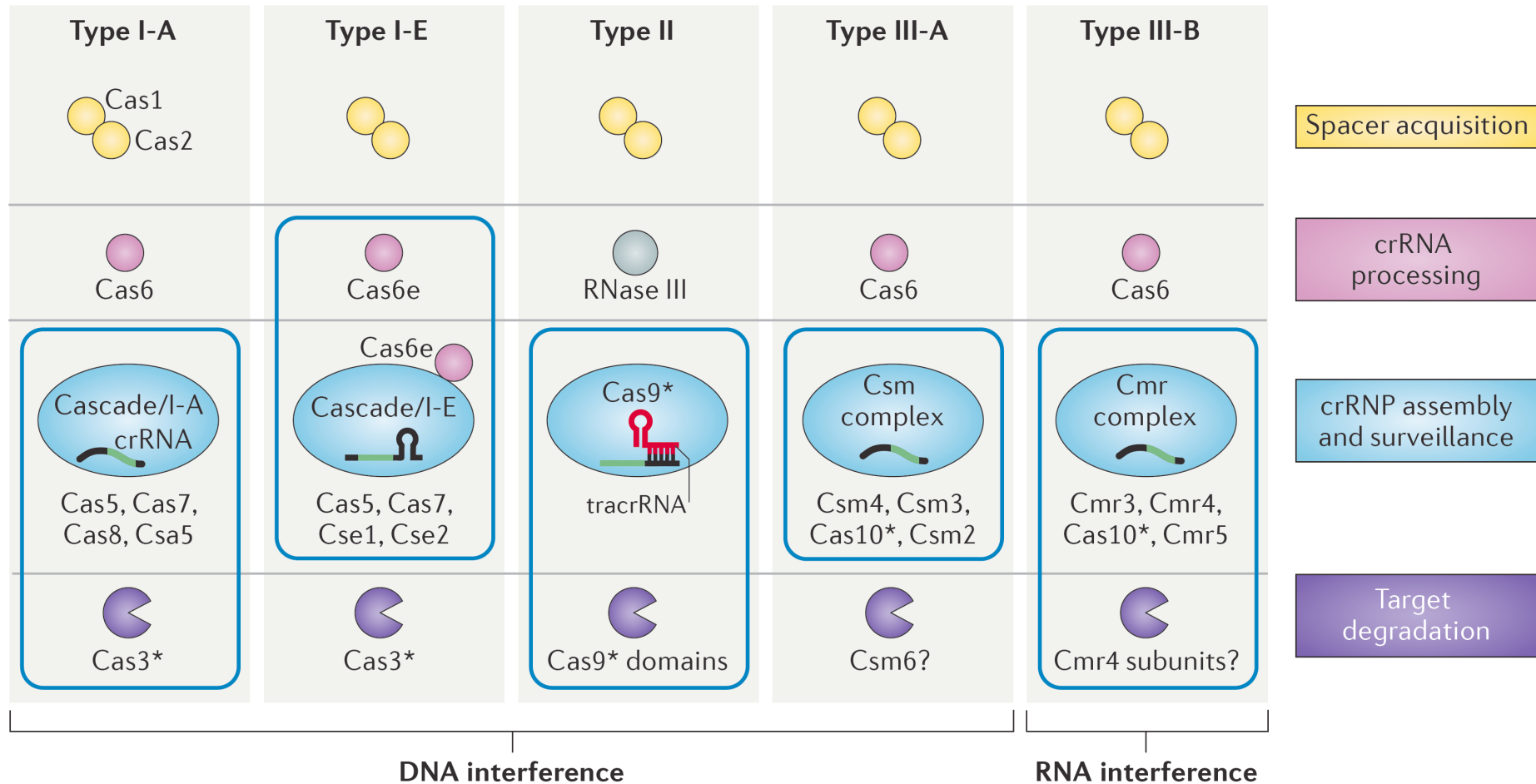
Tras la infección por un fago, algunas bacterias adquieren secuencias derivadas del fago (espaciadores) y ello les **confiere “inmunidad/protección”** frente a nuevas infecciones por el mismo fago

a Stage I: Adaptation



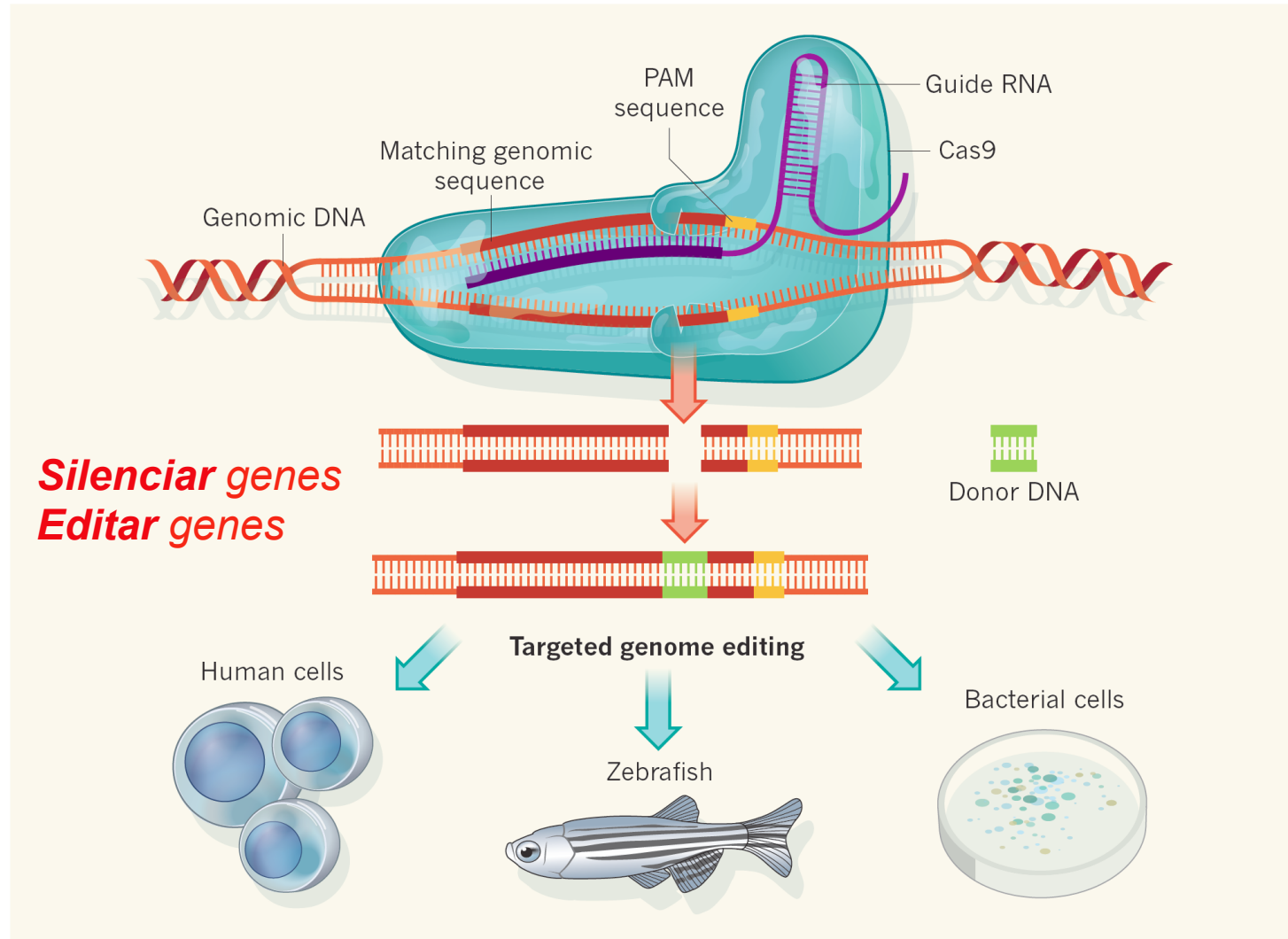
(Deveau et al. 2010)

Tipos de sistemas CRISPR/Cas



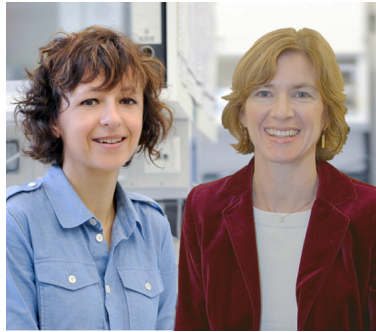
(van der Oost et al., Nat Rev. 2014)

Manipulación génica “a la carta” (silenciar o eliminar genes, corregir mutaciones, insertar nuevas secuencias, etiquetar genes/proteínas.....)



(Charpentier and Doudna, Nat. News and Views 2013)

Emmanuelle Charpentier
(Univ. Umea, Suecia)



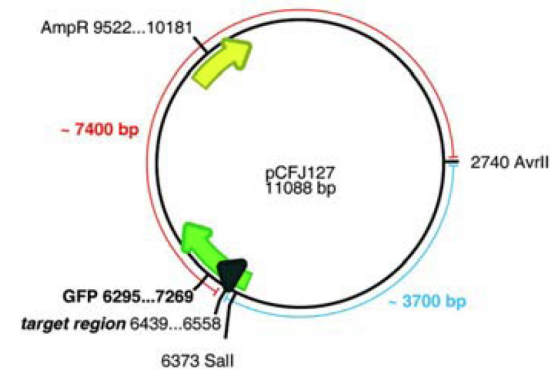
Jennifer Doudna
(Univ. California, Berkeley)

A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

Martin Jinek,^{1,2*} Krzysztof Chylinski,^{3,4*} Ines Fonfara,⁴ Michael Hauer,^{2,†}
Jennifer A. Doudna,^{1,2,5,6‡} Emmanuelle Charpentier^{4‡}

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems provide bacteria and archaea with adaptive immunity against viruses and plasmids by using CRISPR RNAs (crRNAs) to guide the silencing of invading nucleic acids. We show here that in a subset of these systems, the mature crRNA that is base-paired to trans-activating crRNA (tracrRNA) forms a two-RNA structure that directs the CRISPR-associated protein Cas9 to introduce double-stranded (ds) breaks in target DNA. At sites complementary to the crRNA-guide sequence, the Cas9 HNH nuclease domain cleaves the complementary strand, whereas the Cas9 RuvC-like domain cleaves the noncomplementary strand. The dual-tracrRNA:crRNA, when engineered as a single RNA chimera, also directs sequence-specific Cas9 dsDNA cleavage. Our study reveals a family of endonucleases that use dual-RNAs for site-specific DNA cleavage and highlights the potential to exploit the system for RNA-programmable genome editing.

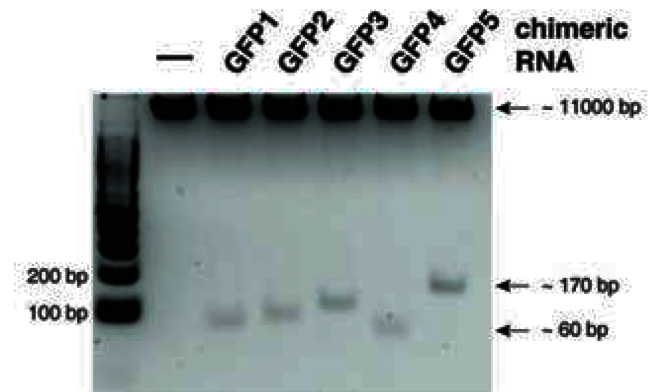
17 AUGUST 2012 VOL 337 SCIENCE www.sciencemag.org



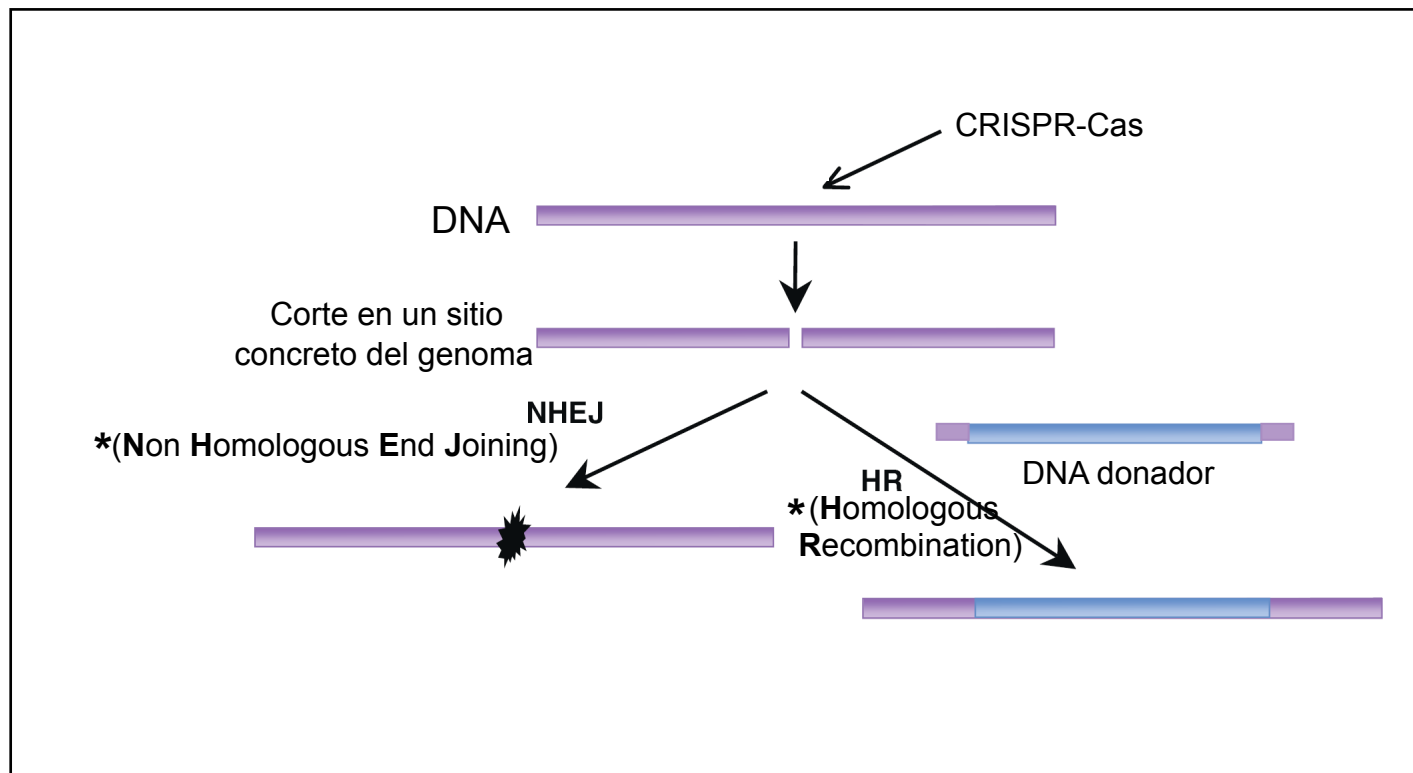
Target region



pCFJ127
Plásmido
+
GFP(1-5)sgRNAs
+
Cas9
+
Sal I(enzima restricción)

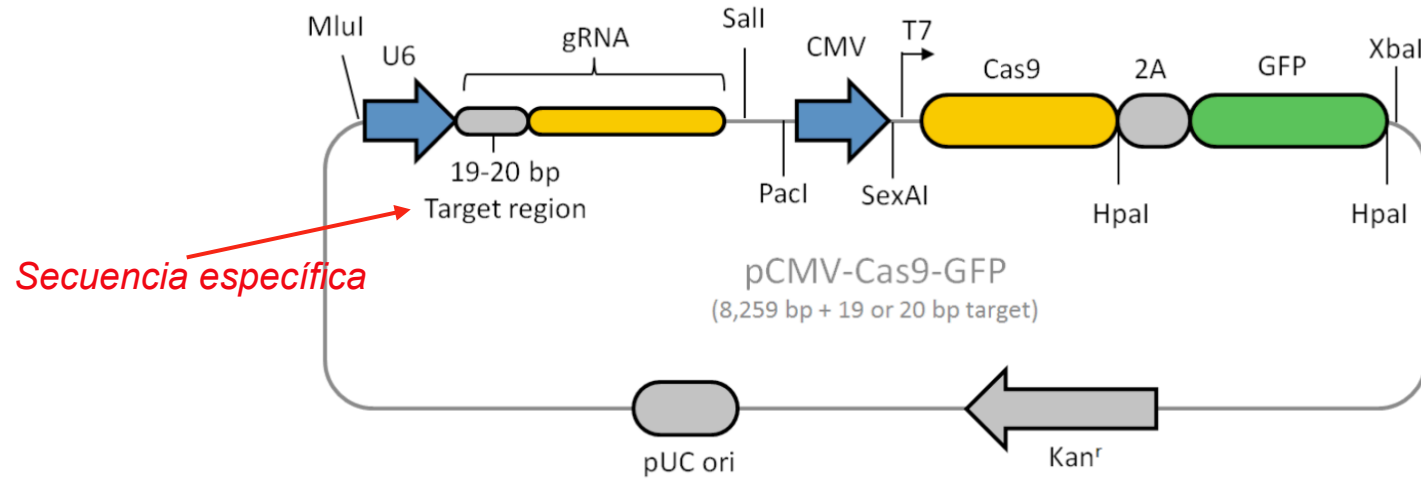


Vías de reparación de los cortes de doble cadena del DNA en células eucariotas

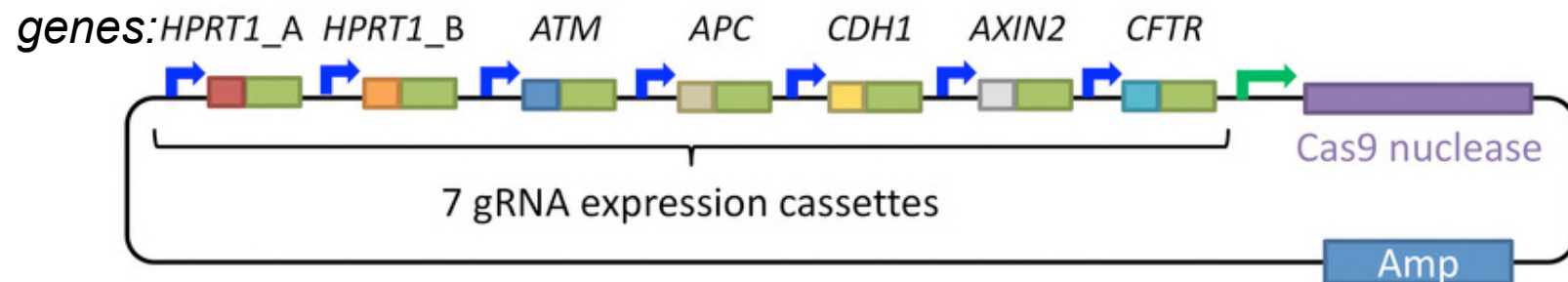


** (Sistemas de reparación de roturas de doble cadena del DNA en la célula)*

Plásmidos con el sistema CRISPR/Cas9

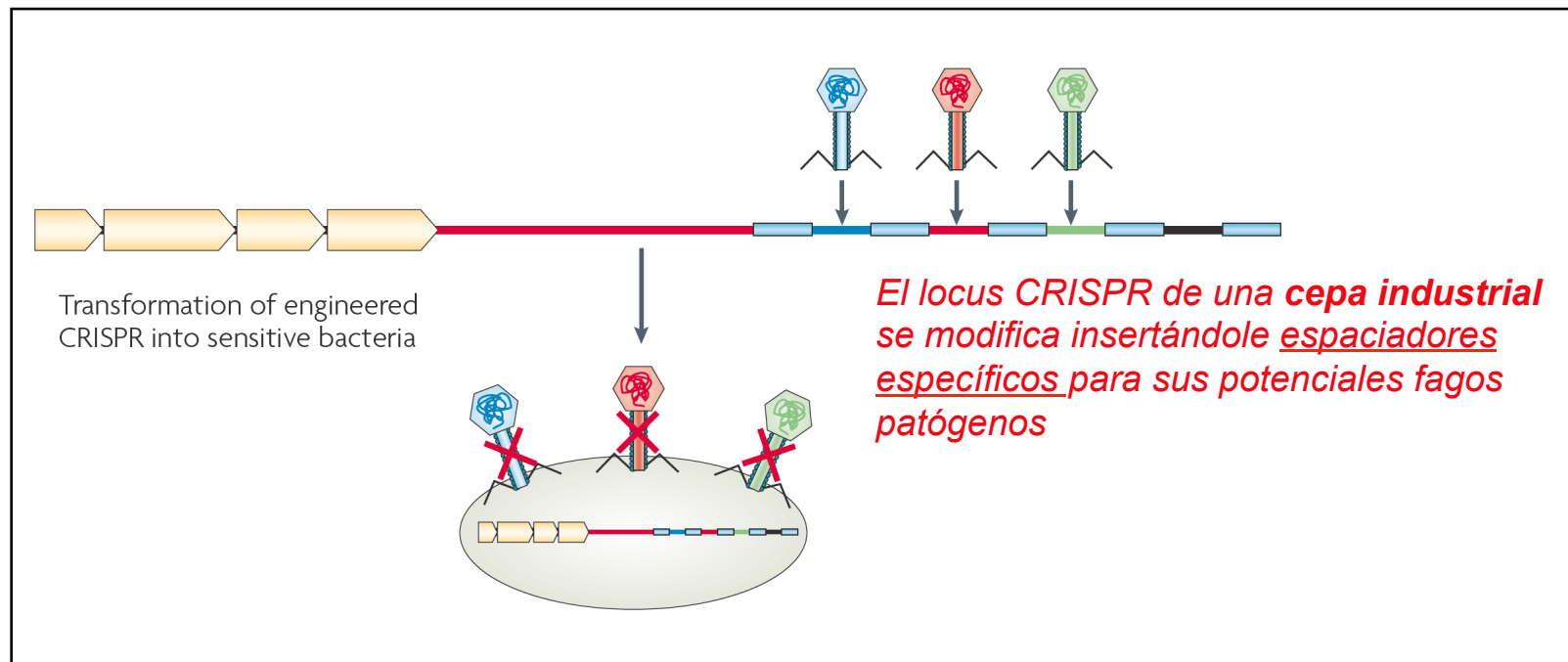


Plásmidos con múltiples RNAs guías



El sistema CRISPR/Cas y sus Aplicaciones
(en Biología, Biotecnología, Biomedicina....)

Construcción de cepas bacterianas de interés industrial Resistentes a fagos patógenos

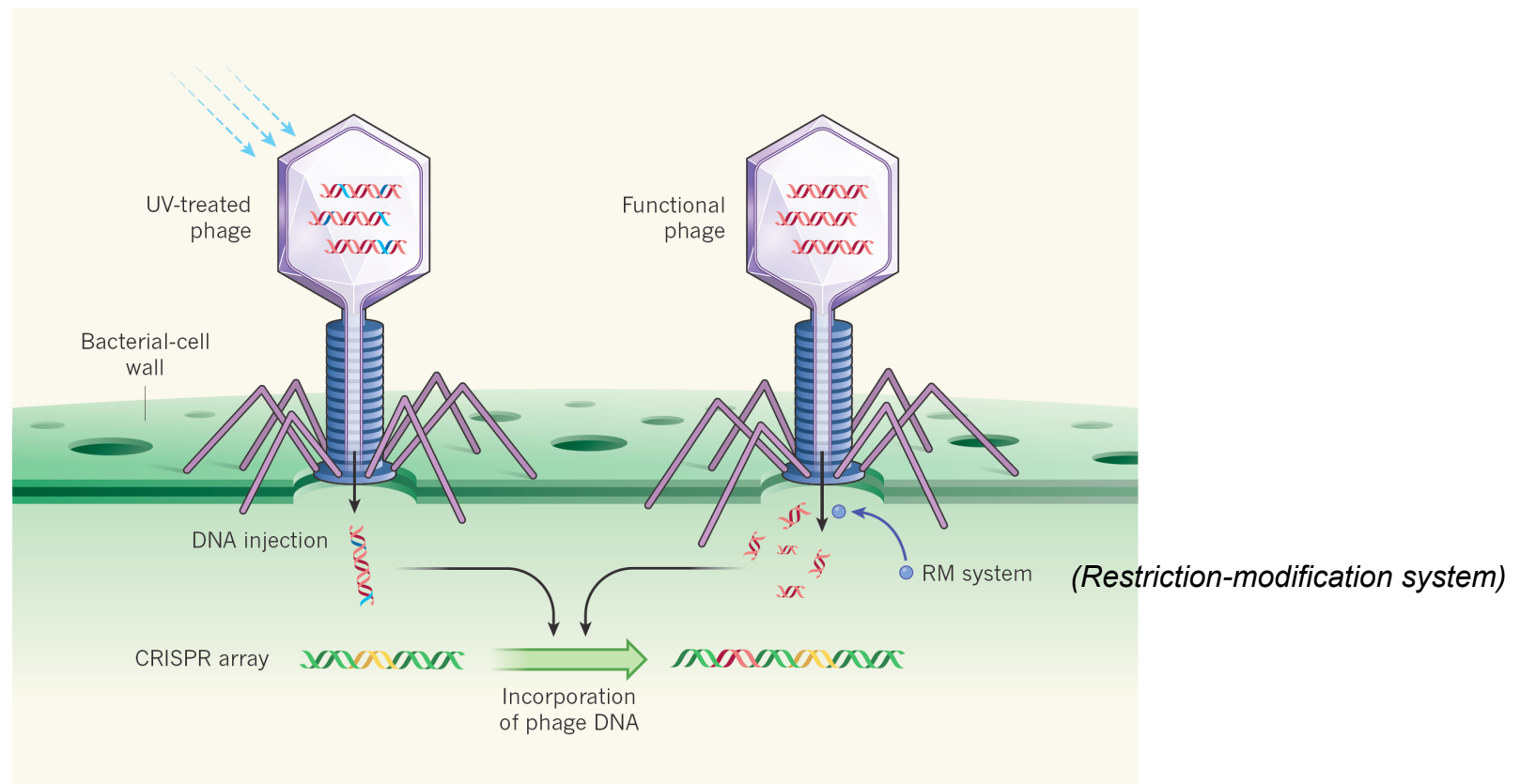


(Adaptado de Sorek et al., Nat Rev. Microbiology 2008)

(Industria láctea, industria del vino, industria farmacéutica, procesamiento de residuos.....)

Bacteria get vaccinated

Infection by defective bacterial viruses that cannot replicate has now been found to be the key feature enabling bacteria to rapidly develop adaptive immunity against functional viruses.



(Hynes et al., Nature 2014)

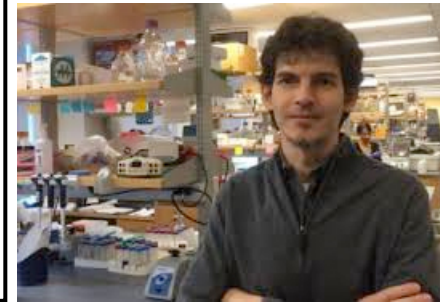
Silenciamiento de genes de virulencia bacterianos

Tratamiento de bacterias patógenas resistentes a antibióticos (Métodos basados en modificaciones del sistema CRISPR/Cas)

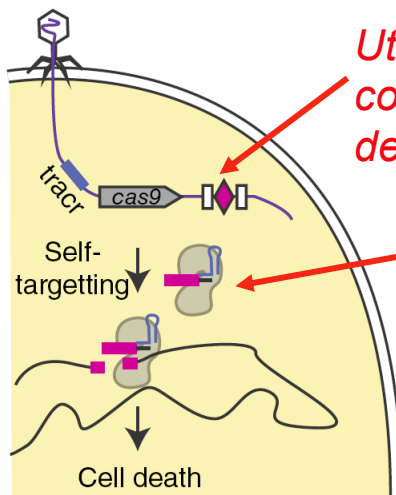
Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials

David Bikard^{1,5}, Chad W Euler^{2,6}, Wenyan Jiang^{1,6}, Philip M Nussenzweig¹, Gregory W Goldberg¹, Xavier Duportet^{3,4}, Vincent A Fischetti² & Luciano A Marraffini¹

VOLUME 32 NUMBER 11 NOVEMBER 2014 NATURE BIOTECHNOLOGY



L.A. Marraffini.
The Rockefeller University



Utilización de bacteriófagos que introducen un sistema CRISPR/Cas9 con secuencias "spacer" frente a genes de virulencia y/o esenciales de la bacteria patógena

La nucleasa Cas9 se dirige a los genes de la bacteria

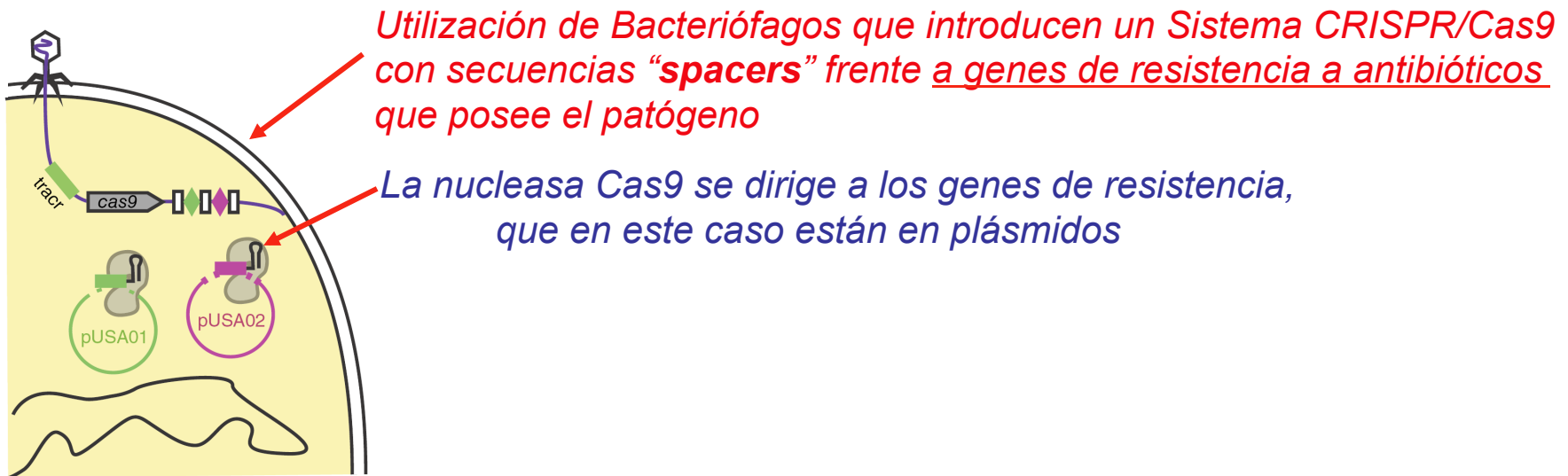
Silenciamiento de genes bacterianos

Tratamiento de bacterias patógenas resistentes a antibióticos (Métodos basados en modificaciones del sistema CRISPR/Cas)

Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials

David Bikard^{1,5}, Chad W Euler^{2,6}, Wenyan Jiang^{1,6}, Philip M Nussenzweig¹, Gregory W Goldberg¹, Xavier Duportet^{3,4}, Vincent A Fischetti² & Luciano A Marraffini¹

VOLUME 32 NUMBER 11 NOVEMBER 2014 NATURE BIOTECHNOLOGY



Silenciamiento de genes en cualquier organismo

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Efficient Gene Knockout in Goats Using CRISPR/Cas9 System



Wei Ni^{1,2}, Jun Qiao³, Shengwei Hu^{2*}, Xinxia Zhao³, Misha Regouski², Min Yang², Irina A. Polejaeva^{2*}, Chuangfu Chen^{3*}

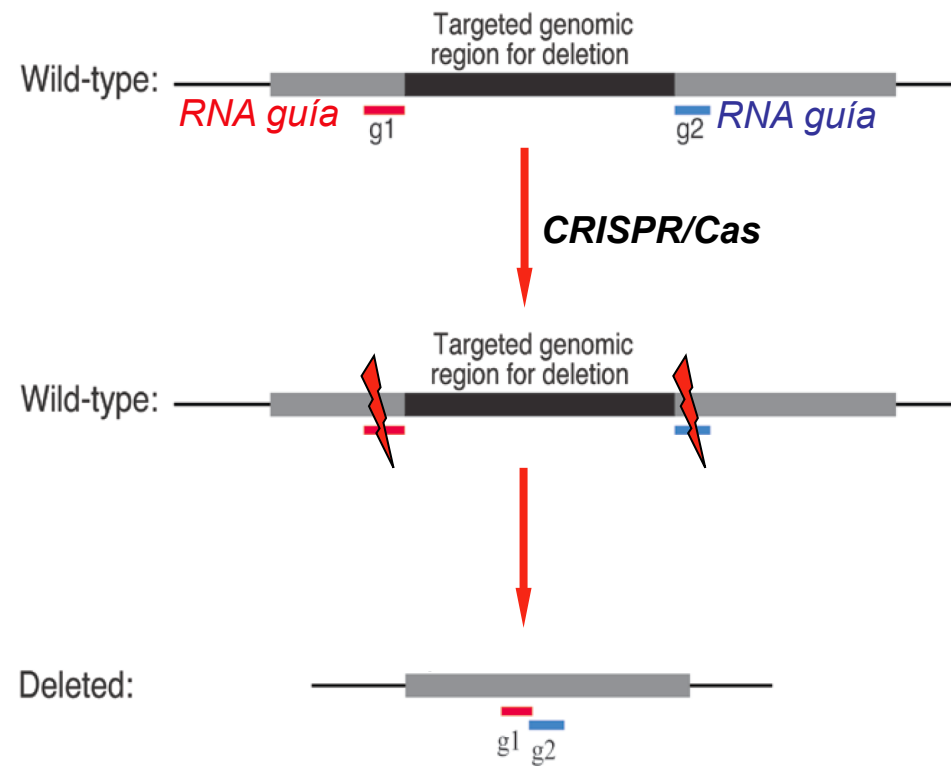
¹ College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, China, ² Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, Utah, United States of America, ³ College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, China

Abstract

The CRISPR/Cas9 system has been adapted as an efficient genome editing tool in laboratory animals such as mice, rats, zebrafish and pigs. Here, we report that CRISPR/Cas9 mediated approach can efficiently induce monoallelic and biallelic gene knockout in goat primary fibroblasts. Four genes were disrupted simultaneously in goat fibroblasts by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. The single-gene knockout fibroblasts were successfully used for somatic cell nuclear transfer (SCNT) and resulted in live-born goats harboring biallelic mutations. The CRISPR/Cas9 system represents a highly effective and facile platform for targeted editing of large animal genomes, which can be broadly applied to both biomedical and agricultural applications.

Terapia génica humana

Eliminar zonas genómicas concretas. Corregir mutaciones.



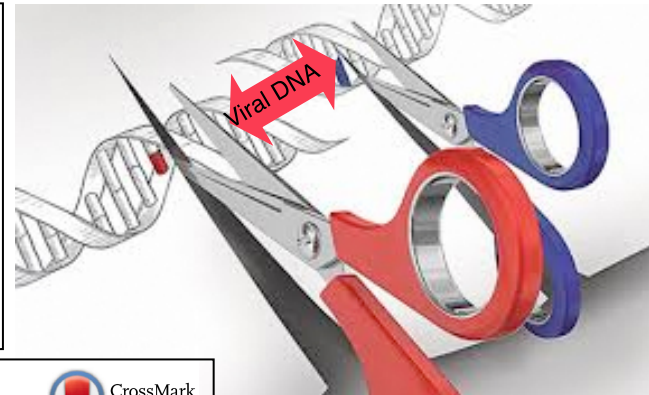
Eliminación de genes virales latentes en el genoma humano

Short Communication

Gene Therapy, (19 May 2016) | doi:10.1038/gt.2016.41

Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study

R Kaminski, R Bella, C Yin, J Otte, P Ferrante, H E Gendelman, H Li, R Booz, J Gordon, W Hu and K Khalili



RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection

Jianbin Wang^a and Stephen R. Quake^{a,b,c,1}

^aDepartment of Bioengineering, ^bDepartment of Applied Physics, and ^cHoward Hughes Medical Institute, Stanford University, Stanford, CA 94305

PNAS | September 9, 2014 | vol. 111 | no. 36 | 13157–13162

Virology 476 (2015) 196–205

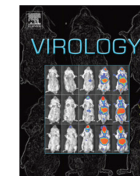


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

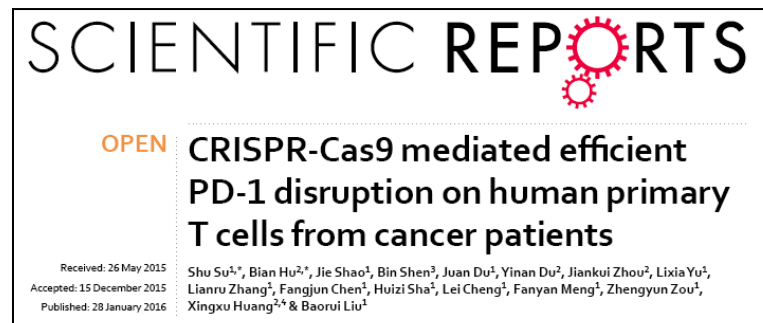


Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease

Edward M. Kennedy^{a,1}, Leda C. Bassit^{b,1}, Henrik Mueller^c, Anand V.R. Kornepati^a, Hal P. Bogerd^a, Ting Nie^b, Payel Chatterjee^b, Hassan Javanbakht^c, Raymond F. Schinazi^{b,*}, Bryan R. Cullen^{a,*}



Terapia génica humana



Prevenir y curar muchas enfermedades:

- Cáncer
- SIDA
- Hepatitis
- Infecciones víricas
- Diabetes
- Distrofia muscular
- Autismo
- Medicina regenerativa
- etc, etc

*El futuro de la Ingeniería Genética basada en el sistema **CRISPR-Cas***

Terapia génica humana

Aplicaciones Biotecnológicas

Mejoras en Agricultura, Ganadería, Industria....

etc, etc, etc,

*Aplicaciones/Logros del sistema **CRISPR-Cas***

Biología sintética: Diseño de rutas metabólicas

Identificación de genes diana de drogas

Cultivos tolerantes a estrés

Control en la maduración de frutos

Mosquitos que no transmiten Malaria

Ganado con más masa corporal

etc, etc, etc



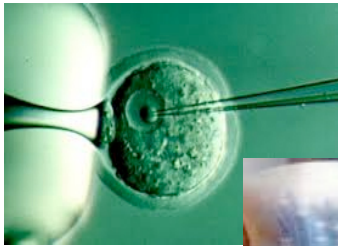
NATURE | NEWS

UK scientists gain licence to edit genes in human embryos

Team at Francis Crick Institute permitted to use CRISPR-Cas9 technology in embryos for early-development research.

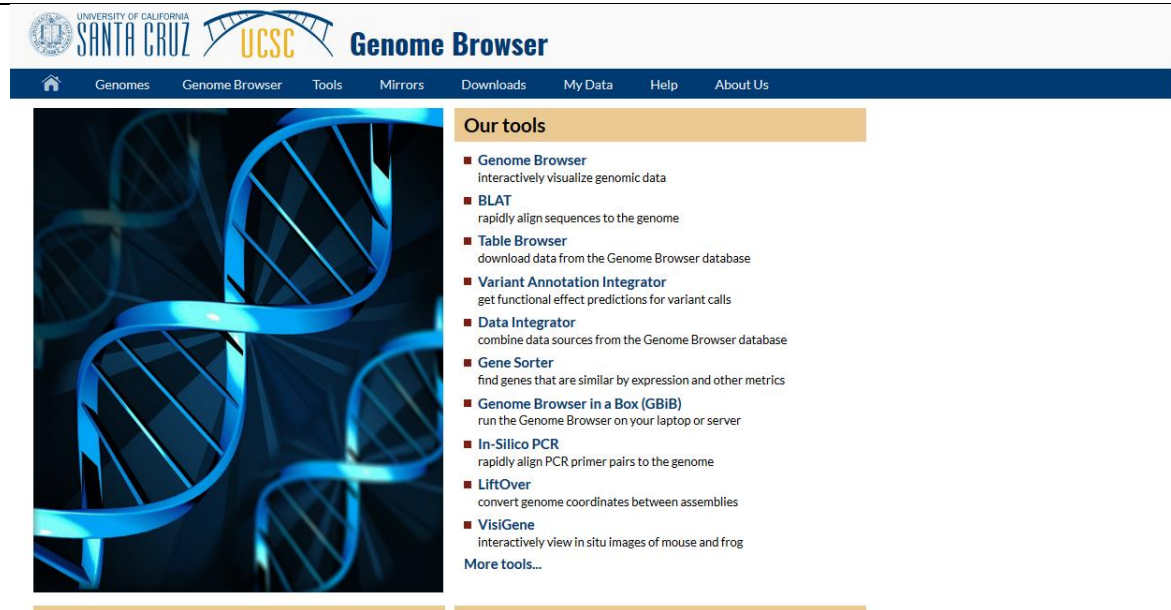
[Ewen Callaway](#)

01 February 2016 | Updated: 01 February 2016

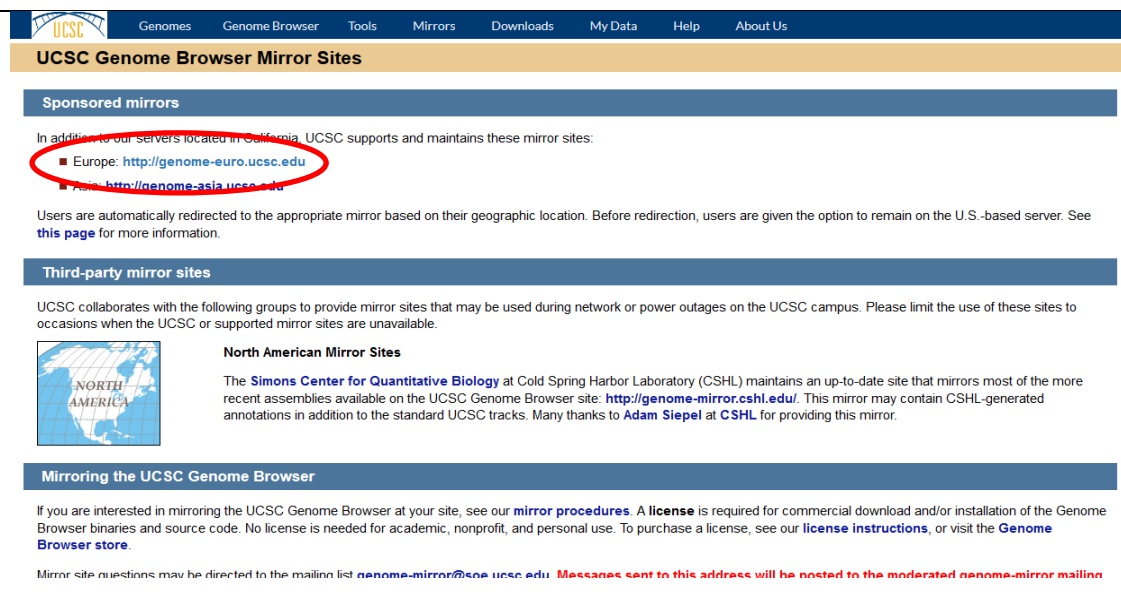


Legislación Consideraciones éticas

Primero: Localización de la secuencia que queremos editar, para ello ir por ejemplo a UCSC Genome Browser



Seleccionar la pestaña Mirrors>Third party mirrors (nos desplazamos al servidor europeo)



Clikar el servidor europeo y seleccionar pestaña **Genomes**. Por defecto sale el genoma humano más actualizado que es el que usaremos. En la ventana **Position/Search term** escribimos *Tumor protein p53* y Clik en **GO**



Genomes

Genome Browser

Tools

Mirrors

Downloads

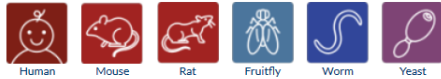
My Data

Help

About Us

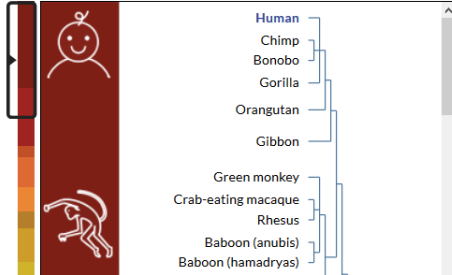
Browse/Select Species

POPULAR SPECIES



Enter species or common name

REPRESENTED SPECIES



Find Position

Human Assembly

Dec. 2013 (GRCh38/hg38)

Position/Search Term

Tumor protein p53

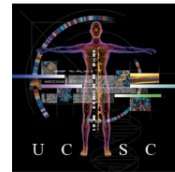
Current position: chr1:11,102,837-11,267,747

GO

Human Genome Browser - hg38 assembly

view sequences

UCSC Genome Browser assembly ID: hg38
Sequencing/Assembly provider ID: Genome Reference Consortium Human GRCh38 (GCA_000001405.15)
Assembly date: Dec. 2013
Accession ID: [GCA_000001405.15](#)
NCBI Genome ID: 51 (Homo sapiens (human))
NCBI Assembly ID: [883148](#) (GRCh38, GCA_000001405.15)
BioProject ID: [31257](#)



Homo sapiens
(Graphic courtesy of CBSE)

Encontramos muchas coincidencias. Vamos a seleccionar la segunda línea que corresponde solo a p53 y no a proteínas que interaccionan con ella como la mayoría de las encontradas. Click

Warning/Error(s):

- Search terms are not very specific, only showing first 500 matching UCSC Genes.

OK

Known Genes

TP53BP1 (uc001zrp.4) at chr15:43407214-43417216 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)
TP53 (uc010cnj.2) at chr17:7674254-7675119 - tumor protein p53 (from HGNC TP53)
TP53BP1 (uc010udq.2) at chr15:43415222-43493156 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)
TP53BP2 (uc057psy.1) at chr1:223780789-223802736 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53BP2 (uc057ptb.1) at chr1:223799917-223802731 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53BP2 (uc057ptc.1) at chr1:223800776-223802657 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53BP2 (uc057ptd.1) at chr1:223801939-223803330 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53BP2 (uc057pte.1) at chr1:223802301-223803223 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53BP2 (uc057ptf.1) at chr1:223804235-223821136 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53BP2 (uc057ptg.1) at chr1:223806911-223826069 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53BP2 (uc057pti.1) at chr1:223814176-223845794 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)
TP53I11 (uc058aru.1) at chr11:44934948-44936056 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)
TP53I11 (uc058arx.1) at chr11:44935578-44950833 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)
TP53I11 (uc058ary.1) at chr11:44935620-44950845 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)
TP53I11 (uc058asa.1) at chr11:44936456-44937250 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)
TP53I11 (uc058asb.1) at chr11:44936668-44950833 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)
TP53AIP1 (uc058jbd.1) at chr11:128935370-128943143 - tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1 (from HGNC TP53AIP1)
TP53BP1 (uc059iq.1) at chr15:43415722-43421057 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)
TP53BP1 (uc059iju.1) at chr15:43441259-43456152 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)
TP53BP1 (uc059ijv.1) at chr15:43446533-43456178 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)
TP53BP1 (uc059ijw.1) at chr15:43447155-43456024 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)

Nos da el mapa de exones/intrones de todas las variantes descritas, debajo sus niveles de expresión en diferentes tejidos y otras características.



Genomes

Genome Browser

Tools

Mirrors

Downloads

My Data

View

Help

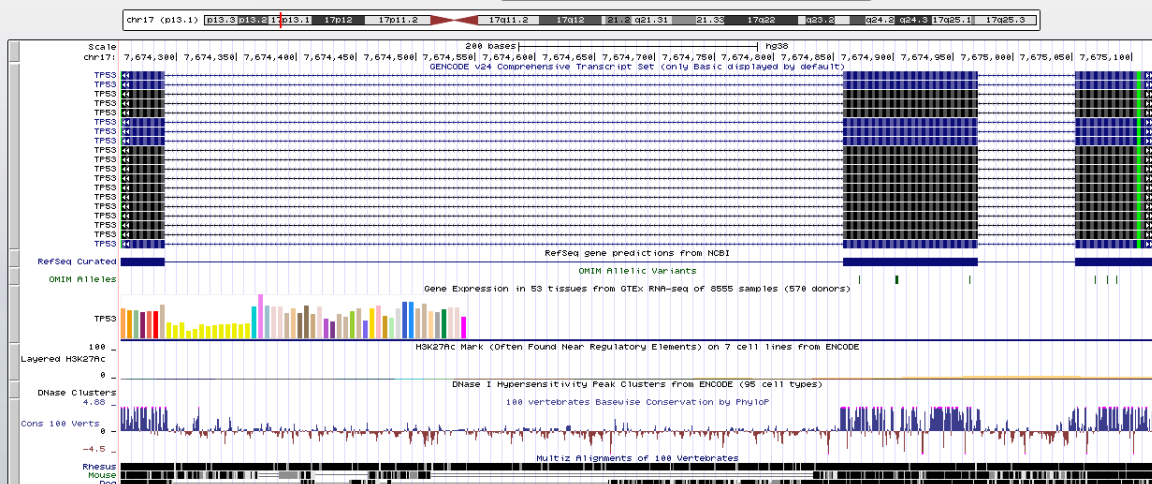
About Us

UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly

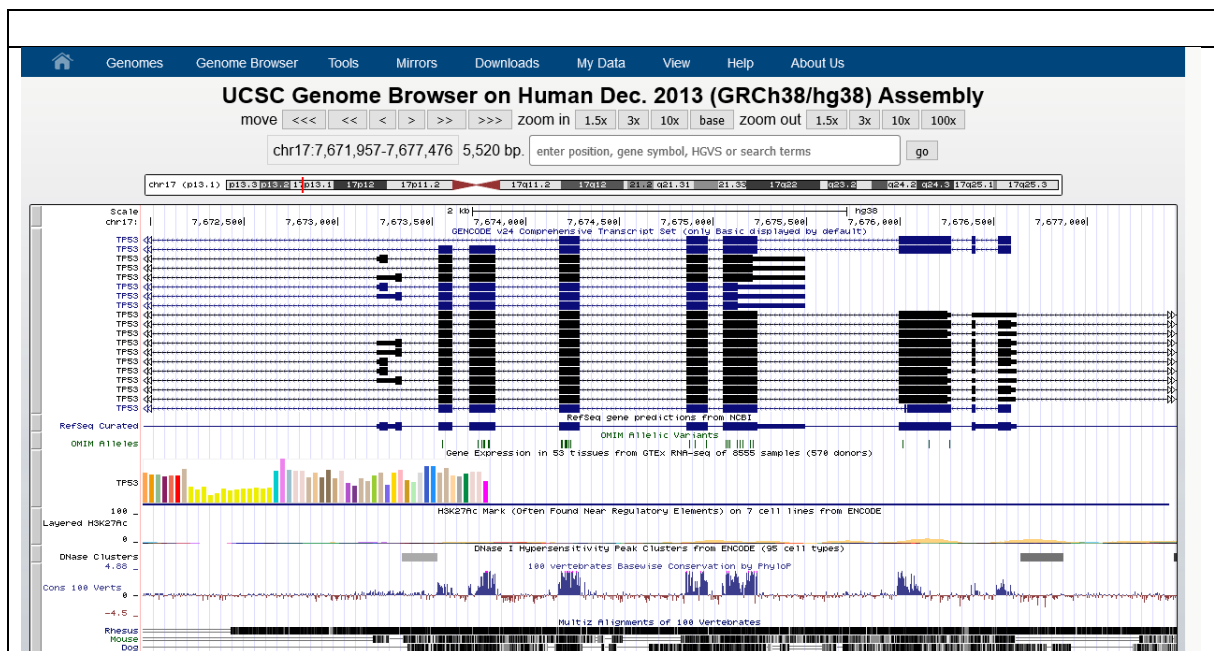
move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x base zoom out 1.5x 3x 10x 100x

chr17:7,674,254-7,675,119 866 bp. enter position, gene symbol, HGVS or search terms

go



Click en Zoom out 10X para ver todo el gen con todos sus exones e intrones



Haciendo Click, por ejemplo en la segunda línea obtenemos toda la información sobre esa variante, descripción, funciones, número de identificación, expresión en tejidos, estructura cristalina, etc.. La revisamos y nos vamos a concentrar en su número de referencia en RefSeq **RefSeq Summary (NM_001126112)** que será el que nos sirva para cargar la secuencia en CHOP CHOP

Human Gene **TP53 (ENST00000359597.8)** Description and Page Index

Description: Acts as a tumor suppressor in many tumor types; induces growth arrest or apoptosis depending on the physiological circumstances and cell type. Involved in cell cycle regulation as a trans-activator that acts to negatively regulate cell division by controlling a set of genes required for this process. One of the activated genes is an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Apoptosis induction seems to be mediated either by stimulation of BAX and FAS antigen expression, or by repression of Bcl-2 expression. (from UniProt J3KR35)

RefSeq Summary (NM_001126112): This gene encodes a tumor suppressor protein containing transcriptional activation, DNA binding, and oligomerization domains. The encoded protein responds to diverse cellular stresses to regulate expression of target genes, thereby inducing cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair, or changes in metabolism. Mutations in this gene are associated with a variety of human cancers, including hereditary cancers such as Li-Fraumeni syndrome. Alternative splicing of this gene and the use of alternate promoters result in multiple transcript variants and isoforms. Additional isoforms have also been shown to result from the use of alternate translation initiation codons from identical transcript variants (PMIDs: 12032546, 20937277). [provided by RefSeq, Dec 2016].

GeneID: ENST00000359597.8

GeneID: ENSG00000141510.16

Transcript (Including UTRs)

Position: hg38 chr17:7,666,086-7,676,594 **Size:** 10,509 **Total Exon Count:** 9 **Strand:** -

Coding Region

Position: hg38 chr17:7,666,206-7,676,594 **Size:** 10,389 **Coding Exon Count:** 9

Page Index	Sequence and Links	UniProtKB Comments	MalaCards	CTD	RNA-Seq Expression
Microarray Expression	RNA Structure	Protein Structure	Other Species	GO Annotations	mRNA Descriptions
Pathways	Other Names	GeneReviews	Methods		

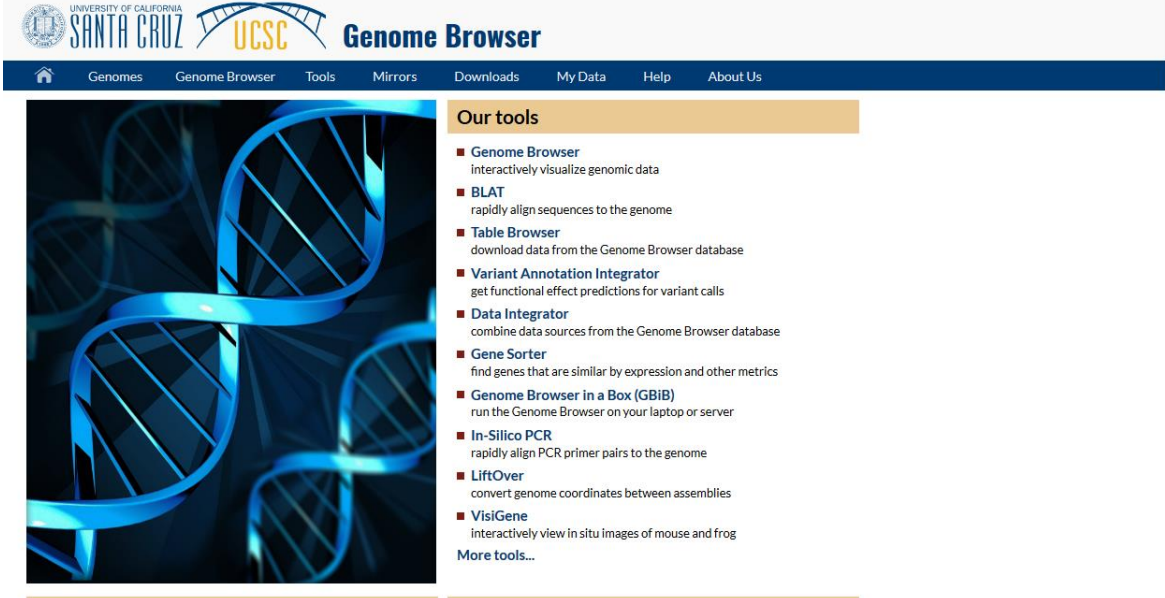
Data last updated: 2016-03-28

Sequence and Links to Tools and Databases

Genomic Sequence (chr17:7,666,086-7,676,594)	mRNA (may differ from genome)	Protein (343 aa)
Gene Sorter	Genome Browser	Other Species FASTA
CGAP	Ensembl	ExonPrimer
	Gene interactions	Table Schema
	GeneCards	Gepis Tissue
		HGNC

Podemos abandonar ahora el UCSC Genome browser y desplazarnos a la web de diseño de guías que más nos guste.

Primero: Localización de la secuencia que queremos editar, para ello Ir a UCSC Genome Browser

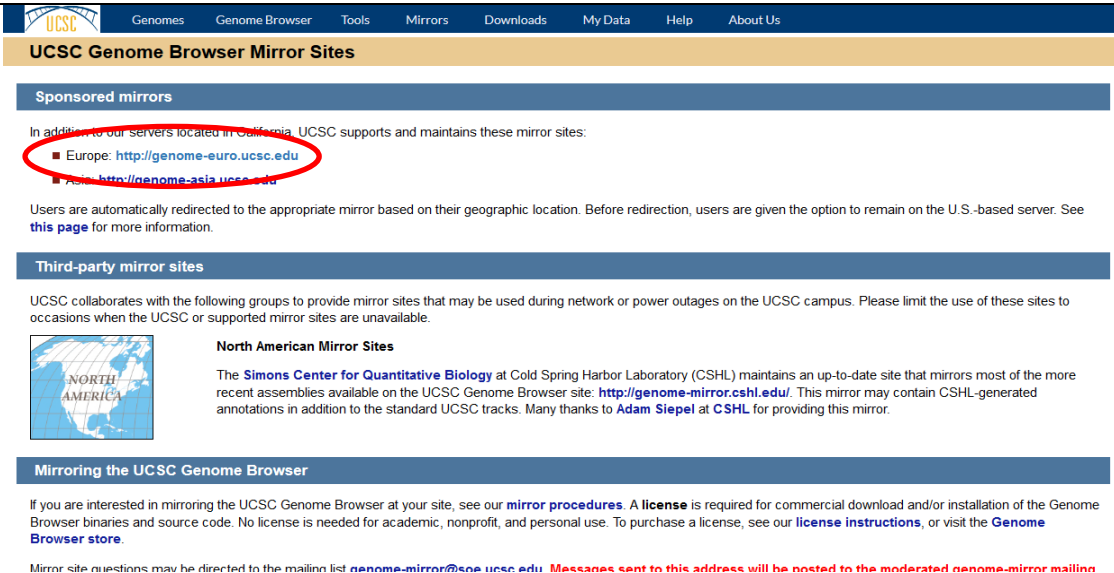


The image shows the UCSC Genome Browser homepage. At the top, there is a navigation bar with links: Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Help, and About Us. Below the navigation bar, there is a large blue DNA double helix graphic on the left. To the right of the graphic, there is a section titled "Our tools" with a list of tools and their descriptions:

- **Genome Browser**
interactively visualize genomic data
- **BLAT**
rapidly align sequences to the genome
- **Table Browser**
download data from the Genome Browser database
- **Variant Annotation Integrator**
get functional effect predictions for variant calls
- **Data Integrator**
combine data sources from the Genome Browser database
- **Gene Sorter**
find genes that are similar by expression and other metrics
- **Genome Browser in a Box (GBiB)**
run the Genome Browser on your laptop or server
- **In-Silico PCR**
rapidly align PCR primer pairs to the genome
- **LiftOver**
convert genome coordinates between assemblies
- **VisiGene**
interactively view in situ images of mouse and frog

Below the list, there is a link: [More tools...](#)

Seleccionar la pestaña Mirrors>Third party mirrors (nos desplazamos al servidor europeo)



The image shows the "UCSC Genome Browser Mirror Sites" page. At the top, there is a navigation bar with links: Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Help, and About Us. Below the navigation bar, there is a section titled "UCSC Genome Browser Mirror Sites".

Sponsored mirrors

In addition to our servers located in California, UCSC supports and maintains these mirror sites:

- **Europe:** <http://genome-euro.ucsc.edu>
- **Asia:** <http://genome-asia.ucsc.edu>

Users are automatically redirected to the appropriate mirror based on their geographic location. Before redirection, users are given the option to remain on the U.S.-based server. See [this page](#) for more information.

Third-party mirror sites

UCSC collaborates with the following groups to provide mirror sites that may be used during network or power outages on the UCSC campus. Please limit the use of these sites to occasions when the UCSC or supported mirror sites are unavailable.

North American Mirror Sites

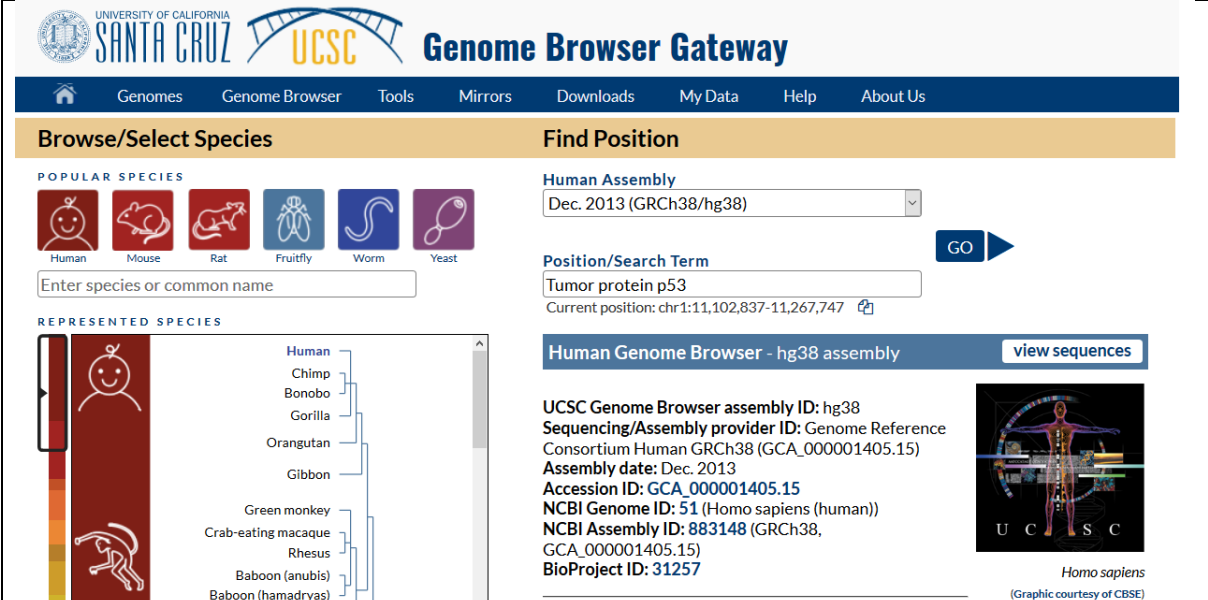
The **Simons Center for Quantitative Biology** at Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) maintains an up-to-date site that mirrors most of the more recent assemblies available on the UCSC Genome Browser site: <http://genome-mirror.cshl.edu/>. This mirror may contain CSHL-generated annotations in addition to the standard UCSC tracks. Many thanks to **Adam Siepel** at CSHL for providing this mirror.

Mirroring the UCSC Genome Browser

If you are interested in mirroring the UCSC Genome Browser at your site, see our [mirror procedures](#). A **license** is required for commercial download and/or installation of the Genome Browser binaries and source code. No license is needed for academic, nonprofit, and personal use. To purchase a license, see our [license instructions](#), or visit the [Genome Browser store](#).

Mirror site questions may be directed to the mailing list genome-mirror@cse.ucsc.edu. **Messages sent to this address will be posted to the moderated genome-mirror mailing list.**

Clickar el servidor europeo y seleccionar pestaña **Genomes**. Por defecto sale el genoma humano más actualizado que es el que usaremos. En la ventana **Position/Search term** escribimos *Tumor protein p53* y Click en **GO**



The image shows the "UCSC Genome Browser Gateway" page. At the top, there is a navigation bar with links: Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Help, and About Us. Below the navigation bar, there is a section titled "Browse/Select Species" and "Find Position".

Browse/Select Species

POPULAR SPECIES

Human Mouse Rat Fruitfly Worm Yeast

Enter species or common name

REPRESENTED SPECIES

Human Chimp Bonobo Gorilla Orangutan Gibbon Green monkey Crab-eating macaque Rhesus Baboon (anubis) Baboon (hamadryas)

Find Position

Human Assembly
Dec. 2013 (GRCh38/hg38)

Position/Search Term
Tumor protein p53
Current position: chr1:11,102,837-11,267,747

GO

Human Genome Browser - hg38 assembly [view sequences](#)

UCSC Genome Browser assembly ID: hg38
Sequencing/Assembly provider ID: Genome Reference Consortium Human GRCh38 (GCA_000001405.15)
Assembly date: Dec. 2013
Accession ID: [GCA_000001405.15](#)
NCBI Genome ID: [51](#) (Homo sapiens (human))
NCBI Assembly ID: [883148](#) (GRCh38, GCA_000001405.15)
BioProject ID: [31257](#)

Homo sapiens
(Graphic courtesy of CBSE)

Encontramos muchas coincidencias. Vamos a seleccionar la segunda línea que corresponde solo a p53 y no a proteínas que interaccionan con ella como la mayoría de las encontradas. Click

- Search terms are not very specific, only showing first 500 matching UCSC Genes.

OK

Known Genes

TP53BP1 (uc001zrp.4) at chr15:43,772,714-43,714,7216 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)

TP53 (uc010cnj.1) at chr17:767,426-767,5119 - tumor protein p53 (from HGNC TP53)

TP53BP1 (uc001oudq.2) at chr15:43,512,222-43,493,9156 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)

TP53BP2 (uc005tpe.y.1) at chr1:223,780,789-223,802,736 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53BP2 (uc005tpb.1) at chr1:223,799,971-223,802,731 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53BP2 (uc005tpc.1) at chr1:223,800,776-223,802,657 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53BP2 (uc005tpd.1) at chr1:223,801,939-223,803,330 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53BP2 (uc005tpe.1) at chr1:223,802,301-223,803,323 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53BP2 (uc005tpf.1) at chr1:223,804,235-223,821,136 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53BP2 (uc005ptg.1) at chr1:223,806,911-223,826,609 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53BP2 (uc005tpi.1) at chr1:223,814,176-223,845,594 - tumor protein p53 binding protein 2 (from HGNC TP53BP2)

TP53I11 (uc0058aru.1) at chr11:44,934,948-44,936,056 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)

TP53I11 (uc0058arx.1) at chr11:44,935,578-44,950,833 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)

TP53I11 (uc0058ary.1) at chr11:44,935,620-44,950,845 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)

TP53I11 (uc0058asa.1) at chr11:44,936,456-44,937,250 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)

TP53I11 (uc0058asb.1) at chr11:44,936,668-44,950,833 - tumor protein p53 inducible protein 11 (from HGNC TP53I11)

TP53AIPI (uc0058jbd.1) at chr11:12,893,357-12,894,3143 - tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1 (from HGNC TP53AIPI)

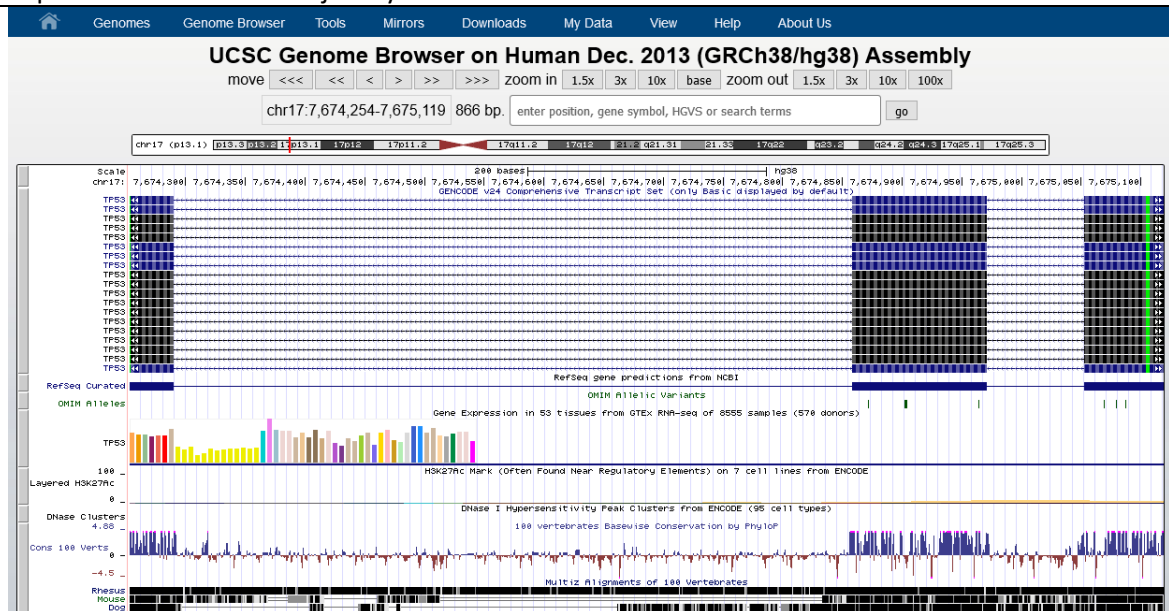
TP53BP1 (uc0059jq.1) at chr15:43,415,722-43,421,057 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)

TP53BP1 (uc0059ju.1) at chr15:43,441,259-43,456,152 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)

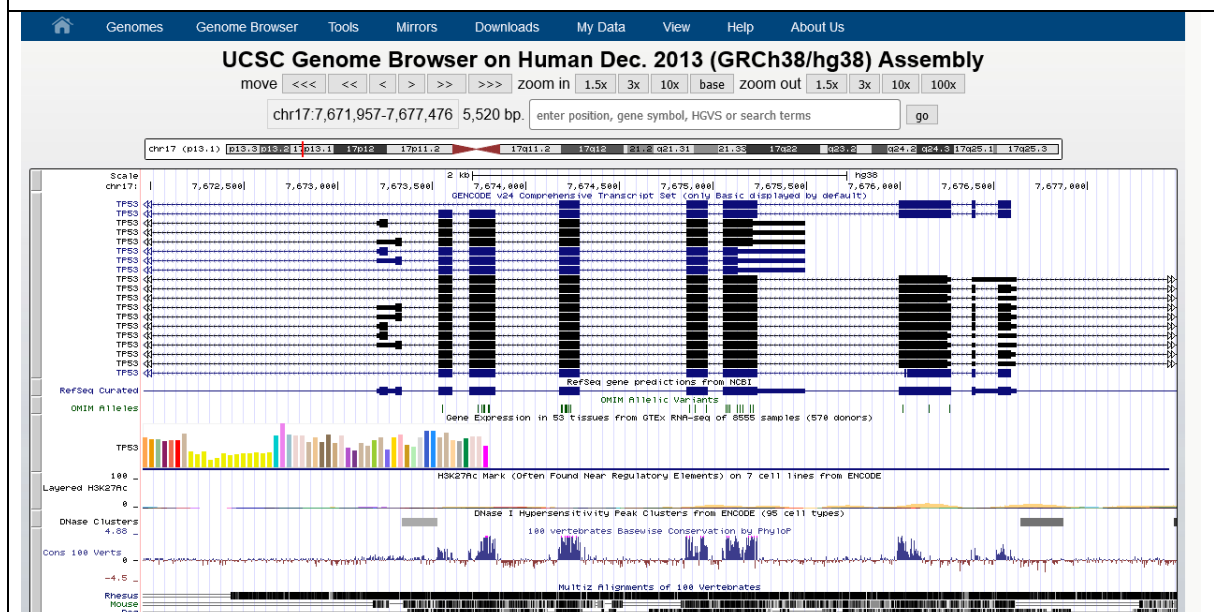
TP53BP1 (uc0059jv.1) at chr15:43,444,653-43,445,618 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)

TP53BP1 (uc0059jw.1) at chr15:43,447,155-43,454,6024 - tumor protein p53 binding protein 1 (from HGNC TP53BP1)

Nos da el mapa de exones/intrones de todas las variantes descritas, debajo sus niveles de expresión en diferentes tejidos y otras características.



Click en Zoom out 10X para ver todo el gen con todos sus exones e intrones



Haciendo Click, por ejemplo en la segunda línea obtenemos toda la información sobre esa variante, descripción, funciones, número de identificación, expresión en tejidos, estructura cristalina, etc.. La revisamos y nos vamos a concentrar en su número de referencia en RefSeq **RefSeq Summary (NM_001126112)** que será el que nos sirva para cargar la secuencia en **CHOP CHOP**

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Help About Us

Human Gene TP53 (ENST00000359597.8) Description and Page Index

Description: Acts as a tumor suppressor in many tumor types; induces growth arrest or apoptosis depending on the physiological circumstances and cell type. Involved in cell cycle regulation as a trans-activator that acts to negatively regulate cell division by controlling a set of genes required for this process. One of the activated genes is an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Apoptosis induction seems to be mediated either by stimulation of BAX and FAS antigen expression, or by repression of Bcl-2 expression. (from UniProt J3KR35)

RefSeq Summary (NM_001126112): This gene encodes a tumor suppressor protein containing transcriptional activation, DNA binding, and oligomerization domains. The encoded protein responds to diverse cellular stresses to regulate expression of target genes, thereby inducing cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair, or changes in metabolism. Mutations in this gene are associated with a variety of human cancers, including hereditary cancers such as Li-Fraumeni syndrome. Alternative splicing of this gene and the use of alternate promoters result in multiple transcript variants and isoforms. Additional isoforms have also been shown to result from the use of alternate translation initiation codons from identical transcript variants (PMIDs: 12032546, 20937277). [provided by RefSeq, Dec 2016].

GeneID: 1959
GeneID Transcript: ENST00000359597.8
GeneID Gene: ENSG00000141510.16
Transcript (Including UTRs)
Position: hg38 chr17:7,666,086-7,676,594 **Size:** 10,509 **Total Exon Count:** 9 **Strand:** -
Coding Region
Position: hg38 chr17:7,666,206-7,676,594 **Size:** 10,389 **Coding Exon Count:** 9

Page Index	Sequence and Links	UniProtKB Comments	MalaCards	CTD	RNA-Seq Expression
Microarray Expression	RNA Structure	Protein Structure	Other Species	GO Annotations	mRNA Descriptions
Pathways	Other Names	GeneReviews	Methods		


Data last updated: 2016-03-28

Sequence and Links to Tools and Databases

Genomic Sequence (chr17:7,666,086-7,676,594)	mRNA (may differ from genome)	Protein (343 aa)
Gene Sorter	Genome Browser	Other Species FASTA
Gene Interactions	Table Schema	BioGPS
CGAP	Ensembl	ExonPrimer
GeneCards	Gepis Tissue	HGNC

Podemos abandonar ahora el UCSC Genome browser y desplazarnos a la web de **CHOP CHOP** <http://chopchop.cbu.uib.no/index.php>. Allí en la ventana **Target** copiaremos el número identificativo de p53, seleccionaremos Homo Sapiens (la misma versión que usamos en UCSC) en la ventana **IN** y seleccionaremos por ejemplo CRISPRCas9 en la ventana **USING**.

Home Instructions Scoring Links About Updates Submissions Contact

CHOPCHOP 

Target

RefSeq/ENSEMBL/gene ID or genomic coordinates.

In

Add new species.

Using

Change default PAM and guide length in Options.

Try ampliCan - our new tool for analysis of CRISPR experiments

Quando hagamos Click en **Find Target Sites** obtendremos el diseño de todas las posibles guías en todos los intrones posibles

HomeInstructionsScoringLinksAboutUpdatesSubmissionsContact

NM_001126112

Download results:

Please select one

[View in UCSC genome browser](#)

Ranking	Target sequence	Genomic location	Exon	Strand	GC (%)	Self-complementarity	Off-targets				Efficiency
							0	1	2	3	
1	ACCAGCAGCTCCTACACGGCGG	chr17:7676119	4	-	65	0	0	0	0	0.75	
2	GTTGCAAAACAGACCTCAGGCGG	chr17:7674845	6	+	55	0	0	0	0	0.71	
3	CTGAGCAGCGCTCATGGGGGG	chr17:7675062	5	+	65	2	0	0	0	0.69	
4	GAGCGCTGCTCAGATAGCGATGG	chr17:7675052	5	-	60	1	0	0	0	0.66	
5	TCGACGCTAGGATCTGACTGCGG	chr17:7676563	2	+	55	2	0	0	0	0.66	
6	CCATTGTTCAATATCGCCGGG	chr17:7676210	4	+	45	0	0	0	0	0.62	

Debajo una tabla con las secuencias de todas las guías, ordenadas primero por las que no tienen OFF Targets (cortes no desados) y luego por la eficiencia prevista de corte en orden descendente. También la posición en cromosoma, la hebra codificante, el % de GC y la posibilidad de autoanillamientos.

Haciendo Click en la primera fila de la tabla, nos da los detalles correspondientes.

HomeInstructionsScoringLinksAboutUpdatesSubmissionsContact

NM_001126112

Download an annotated GenBank file of the results [here](#)

Download an csv table of the primers [here](#)

Gene specific part of sgRNA	
ACCAGCAGCTCCTACACGGCGG	
There are no predicted off-targets for this guide	

Pair	Left primer coordinates	Left primer	Left primer Tm	Left primer off-targets	Right primer coordinates	Right primer	Right primer Tm	Right primer off-targets	Pair off-targets	Product size
1	chr17:7676196-7676218	AACATGGTTCACCTGAAGACCC	60.3	0	chr17:7676960-7676972	AGGCATTGAAGTCTCTGGAAG	60.6	0	0	268
2	chr17:7676196-7676218	AACATGGTTCACCTGAAGACCC	60.3	0	chr17:7676964-7676976	ATTGAAGTCTCATGGAAGCCAG	60.6	0	0	264
3	chr17:7676236-7676306	CTGGTCCTCTGACTGCTCTTTT	60.1	0	chr17:7676966-7676977	CCTGGTAGGTTTCTGGGAAG	60.0	0	0	232
4	chr17:7676236-7676306	CTGGTCCTCTGACTGCTCTTTT	60.1	0	chr17:7676967-7676978	CTGGTAGGTTTCTGGGAAG	60.0	0	0	251
5	chr17:7676236-7676306	CTGGTCCTCTGACTGCTCTTTT	60.1	0	chr17:7676967-7676988	TTCTGGGAAGGACAGAAGAT	60.1	0	0	241

La secuencia de la Guía con su secuencia PAM. Las enzimas de restricción que cortan en esa zona por si queremos comprobar el corte de esa forma y los posibles Primers a usar si la comprobación la queremos hacer por PCR. En la tabla de abajo los datos correspondientes a este último análisis.